

LUCIANA MOLLO

**Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na
composição de carboidratos não-estruturais de plantas de
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms (Bromeliaceae)
cultivadas *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

2009

LUCIANA MOLLO

**Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na
composição de carboidratos não estruturais de plantas de
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms (Bromeliaceae)
cultivadas *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. RITA DE CÁSSIA LEONE FIGUEIREDO RIBEIRO

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Mollo, Luciana
M727e Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na composição de carboidratos não-estruturais de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro* / Luciana Mollo -- São Paulo, 2009.
90 p.il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2009
Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Temperaturas baixas. I. Título

CDU : 582.564

Aos meus pais, João e Teresa (*in memoriam*) pela dedicação de toda uma vida e pelo orgulho com que acompanharam meus passos, meus irmãos maravilhosos, Mario e Flávia, por todo o incentivo e minha filha amada Isabella, por entender o meu sonho e a falta de colo em muitos momentos...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Botânica por ter me dado a oportunidade de conviver com profissionais e pessoas especiais que só contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, em especial a Dra Sonia Dietrich, Dra. Solange C. Mazzoni-Viveiros, Marcinha e Antônio.

À Secretaria da Educação do Estado de São Paulo pela bolsa mestrado concedida.

À Dra Rita de Cássia L. Figueiredo Ribeiro, minha orientadora, que mesmo quando não me conhecia, ofereceu seu apoio, investindo seu tempo e paciência na minha formação.

À Dra Catarina Carvalho Nievola por ter me adotado sem questionamentos e ter oferecido sua amizade, dedicação e orientação me conduzindo pelos caminhos da fisiologia vegetal.

A eterna orientadora, amada e amiga Dra Maria das Graças Lapa Wanderley, por ter feito com que eu me apaixonasse pelo mundo da pesquisa e pelas Bromélias.

Aos meus pais, João e Teresa, por me mostrarem a importância do estudo, a importância da cultura, por serem pessoas de caráter primoroso por terem me dado uma família maravilhosa, mostrando que o amor é o valor maior da vida e por acreditarem no meu sonho de ser “cientista”. Ao meu pai que permaneceu ao meu lado todos os dias lendo meu trabalho, ouvindo minhas queixas, presenciando meu cansaço e sempre me incentivando a prosseguir.

Ao meu irmão, Mário e minha cunhada Sônia, que me fizeram acordar num momento de frustração, me levando a acreditar que perseguir meu sonho ainda era possível. Por me acompanharem com seus telefonemas de incentivo, ouvir pacientemente a prévia da minha qualificação, dando conselhos, sempre com amor e dedicação. Aos meus sobrinhos queridos, Vitor e Arthur, por todo o carinho desde sempre.

A minha irmã Flávia por me ajudar na preparação para a prova de Inglês, pela versão dos resumos da tese e por sua amizade sempre e meu cunhado René pelo companheirismo e a paciência.

A minha filha querida, Isabella, que com seus onze anos teve a maturidade de entender e suportar todos os meus períodos de ausência, pela ajuda que sempre me deu até na decoração dos

slides de apresentação da qualificação, dos painéis dos congressos e pelo grande amor que sempre me dedicou. Nenhum outro bem na vida é maior que sua amizade e amor.

À Dra. Inês Cordeiro. Você não imagina o quanto suas palavras foram importantes para o meu retorno ao Instituto de Botânica.

A Dra Vivian Tamaki, Dr. Shoey Kanashiro, Dr Armando, Dr Clovis e Dr Francismar pela amizade e companheirismo durante toda a minha estada na Seção de Plantas Ornamentais do Ibt, pelas palavras de incentivo e participação na minha formação.

A Cleonice e Ivomar pela convivência sempre agradável.

As queridas amigas que ganhei de Deus nesse percurso, Elisa, Daniela, Flávia, Rosmary, Patrícia e Luciana Cabral, por terem me ensinado os primeiros passos no laboratório, pelos bons momentos, pelos momentos de estresse, pelos almoços, conversas e risadas.

Ao Jorge por sua boa companhia e por me escutar em inúmeros almoços no restaurante do jardim botânico.

À Mary Monteiro e a Ana Alice que me auxiliaram em tudo o que puderam nos meus trabalhos no laboratório na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do IBT.

Aos amigos e colegas de laboratório, César, Denise, Fernanda M., Fernanda K., João, Kelly, Marina, Monali, Paola, Roberta, Rodrigo e Vanessa Costa pela convivência e ajuda, conversas, risadas.

À Vanessa Oliveira, por ter me apresentado o Laboratório da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas e por sempre me atender em todas as minhas duvidas e dificuldades, por me acompanhar em todos os momentos no HPLC, por me ajudar a interpretar os dados e por ser um exemplo de pessoa e profissional.

À Juliana Iura pela ajuda na extração de amido, interpretação dos gráficos, dicas e palpites sempre bem-vindos.

À Dra Nair Itaya por me ensinar a fazer as tabelas e cálculos e várias técnicas para análises bioquímicas.

À Dra. Márcia R. Braga e ao Dr. Emerson Alves da Silva pela colaboração nas etapas finais da dissertação.

Aos inúmeros amigos que fiz durante todo o período de Botânico.

Aos meus colegas de trabalho da EE Dr. Baeta Neves, EE Profª Palmira Grassiotto Ferreira da Silva e Colégio Singular por todo o apoio que me deram neste período e principalmente aos meus alunos que de alguma forma sempre perguntavam sobre meus trabalhos de pesquisa. Adoro todos vocês!

À minha amiga e ex aluna Elisângela Moreno por ter aguentado todos os meus desabafos e ter me dado seu ombro nos momentos difíceis me dizendo sempre que eu iria conseguir, sendo minha companheira de msn, de balada, de risadas e lamentos. Sua amizade não tem preço.

A Deus, por ter tornado o meu sonho realidade.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

"O que dá o verdadeiro sentido ao encontro é a busca,
e é preciso andar muito para se alcançar o que está perto."

José Saramago

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
BROMELIACEAE	1
<i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms	3
TEMPERATURA E DESENVOLVIMENTO	7
CARBOIDRATOS E TEMPERATURAS BAIXAS	12
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	16
OBJETIVOS	18
LITERATURA CITADA	19
CAPÍTULO 1 . Efeito da temperatura no crescimento de plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas <i>in vitro</i>	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
Obtenção do material vegetal	32
Condições de cultivo	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
LITERATURA CITADA	48
CAPÍTULO 2 . Efeito da temperatura no conteúdo e na composição de carboidratos não estruturais em plantas de <i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas <i>in vitro</i>	51
RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	52

INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS	56
Obtenção do material vegetal	56
Condições de cultivo	56
Extração e análise de carboidratos solúveis	59
Quantificação de amido	62
RESULTADOS	64
DISCUSSÃO	77
LITERATURA CITADA	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
RESUMO	90
ABSTRACT	92
ANEXOS.....	94

Introdução

Bromeliaceae

Bromeliaceae é considerada a maior família de fanerógamas de distribuição neotropical (Gilmartin 1973), reunindo 57 gêneros e 3086 espécies (Luther 2004). A família é tradicionalmente subdividida nas subfamílias Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae que podem ocorrer em todos os ecossistemas compreendidos entre o sul dos Estados Unidos, o leste brasileiro e a região central da Argentina e do Chile. Essas plantas ocorrem desde o nível do mar até as montanhas andinas a cerca de 4.000 metros de altitude (Smith & Downs 1974), sendo citada apenas a espécie *Pitcairnia felicianae* existente na costa ocidental da África. Seus representantes são encontrados em todos os tipos de vegetação, desde ambientes mesofílicos até xéricos (Smith & Downs 1974, Benzing 2000). No Brasil, ocorrem cerca de 40% das espécies e 73 % dos gêneros, sendo que destes, 80% são encontrados na Mata Atlântica (Leme & Marigo 1993).

Bromeliaceae é caracterizada por reunir plantas epífitas, terrícolas, rupícolas ou saxícolas, com caule geralmente curto e recoberto por bainhas foliares. As folhas são alternas, polísticas ou dísticas, em geral formando roseta em torno do caule. A superfície foliar é recoberta por tricomas especializados (escamas foliares) e as margens podem ser inteiras, serrilhadas ou espinescentes, com bainhas geralmente alargadas. As inflorescências são, em geral, racemosas, simples ou ramificadas. O escapo pode ser longo até quase sésil, sendo freqüentemente coberto por brácteas foliáceas ou coloridas. As flores são geralmente vistosas (Cronquist 1981, Dahlgren *et al.* 1985), contrastando com as brácteas e os frutos do tipo cápsula ou bagas com sementes que podem ser apendiculadas ou não (Smith & Downs 1974). Aspectos gerais e detalhes das inflorescências de alguns representantes de Bromeliaceae estão mostrados na figura 1.



Figura 1. Exemplos de Bromeliaceae: *Ortophytum* sp (A), *Ananas* sp (B), *Vriesea hieroglyphica* (C), *Vriesea* sp (D), *Alcantarea imperialis* (E) e esquema de formação de tanque em bromélias (F).

Os indivíduos de Bromeliaceae desempenham importante função ecológica, servindo de habitat, local de reprodução e alimentação para pequenos animais que vivem associados aos seus “tanques” (fitotelmo), que são estruturas formadas pela sobreposição das folhas da roseta que servem como reservatório de água e nutrientes (Benzing 2000), como ocorre em *Alcantarea imperialis* (figura 1 E, F).

Pela beleza que apresentam e por sua importância econômica, as bromélias destacam-se dentre as principais plantas ornamentais tropicais. Além disso, são usadas como produtoras de fibras, na medicina popular e na alimentação (Reitz 1983, Leme & Marigo 1993).

Devido ao seu valor ornamental, várias espécies de Bromeliaceae sofrem ação humana extrativista e predatória em seus habitats naturais e encontram-se ameaçadas de extinção. A procura de determinadas espécies de bromélias é cada vez maior e a produção para a comercialização, nem sempre atende à demanda. Dentre as espécies mais procuradas e que sofrem ação predatória encontram-se os representantes dos gêneros *Vriesea* e *Alcantarea*, ambos da subfamília Tillandsioideae. *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, conhecida como bromélia imperial, por exemplo, é retirada ilegalmente de seu habitat e vendida em grandes centros como na CEAGESP (Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo) ou em feiras livres, sendo usada para decoração de jardins e sacadas de prédios. Muitos dos indivíduos não sobrevivem nessas condições, acarretando a procura de novos exemplares para sua reposição, prejudicando ainda mais a conservação da espécie (Nunes & Forzza 1998).

***Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms**

Alcantarea imperialis apresenta hábito saxícola ou rupícola, crescendo naturalmente sobre afloramentos rochosos ou solos rasos e pedregosos, sendo exposta a alta luminosidade. Pode atingir de 3 a 5 metros de altura, com folhas dispostas em roseta vistosa de aproximadamente 1,5 metros de diâmetro. A inflorescência projeta-se, excedendo as folhas, com numerosas flores alvas

contrastantes com as brácteas vermelhas (figura 2). É nativa da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, área de Floresta Tropical e Campos de Altitude, que acima de 800 metros possui clima mesotérmico brando, com temperaturas médias de 19 °C, que podem oscilar entre 40 °C e 5 °C em um único dia. A espécie, portanto, tem grande plasticidade a variações de temperatura, sendo considerada tolerante ao frio (Andreas 2006).

Segundo o Programa de Proteção das Espécies Ameaçadas de Extinção da Mata Atlântica Brasileira, da Fundação Biodiversitas, pela avaliação no "Workshop de revisão da lista da Flora Brasileira ameaçada de extinção" de junho de 2005, esta bromélia 'encontra-se na categoria "Espécie em perigo de extinção". Seu ciclo de vida é longo, com cerca de 10 anos para atingir a maturidade, o que amplia o grau de ameaça a esta espécie. Portanto, o desenvolvimento de estratégias de conservação é fundamental para a sua proteção contra a extinção.

Segundo Duran e Monteiro (2001), a utilização de plantas nativas como as bromélias nos jardins em São Paulo é uma tendência atual, o que aumenta a pressão de extrativismo ilegal dessas plantas da Mata Atlântica para serem oferecidas a varejistas e atacadistas do mercado de flores, levando ao aumento do desmatamento. Nesse contexto, *Alcantarea imperialis* aparece como a espécie preferida nesse tipo de comércio, que carece ainda de um número representativo de plantas provenientes de produção legalizada da espécie. Assim, estudos sobre a fisiologia de *Alcantarea imperialis* podem contribuir para incrementar essa produção e também para estabelecer estratégias de conservação, como a formação de coleções e bancos de germoplasma.



Figura 2. *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromélia imperial) – exemplar existente no Instituto de Botânica de São Paulo. Foto gentilmente cedida por Dr. Shoey Kanashiro.

Aspectos fisiológicos de *Alcantarea imperialis* já foram abordados em alguns trabalhos relacionados ao desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* visando à otimização da micropropagação para produção de mudas (Naves 2001), ou à avaliação do desenvolvimento das

mudas produzidas *in vitro*, cultivando-as em diferentes substratos (Rodrigues *et al.* 2003). Entretanto, não foram encontrados estudos que aprofundam o conhecimento sobre a plasticidade dessa espécie em relação à adaptação às alterações de temperatura que ocorrem em seu ambiente natural.

Assim como *A. imperialis*, diversas espécies de Bromeliaceae vivem em condições consideradas estressantes, sobre rochas, epífitas no dossel de árvores, expostas a temperaturas extremas, seca, sol intenso e escassez de nutrientes (Benzing 2000). Medina (1974) já havia documentado a ocorrência de *A. imperialis* em ambientes variados. As alterações na morfologia dessas plantas em função do ambiente podem ser tão intensas, a ponto de resultar em implicações taxonômicas, como as relatadas para *Nidularium procerum*. Levantamentos realizados sobre a ocorrência de *N. procerum* comprovaram que devido à sua distribuição ampla, ocorrendo como terrestre ou epífita, desde o Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, foram desenvolvidas populações com características muito distintas, que podem até ser consideradas como táxons separados. Segundo Moreira (2002), provavelmente, em decorrência disso, os diferentes nomes que foram propostos para *N. procerum* e *N. meeanum* poderiam referir-se apenas a variações morfológicas da mesma espécie.

A ocorrência e adaptação das bromélias a diferentes ambientes têm revelado a presença de diversas estratégias metabólicas nos representantes da família, incluindo o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). Essas estratégias foram relacionadas à sobrevivência dessas plantas a essas condições por Endres & Mercier (2001) e Nievola *et al.* (2001), utilizando a técnica de micropropagação. Constituem, portanto, um interessante modelo para estudos de fisiologia básica, como os que avaliam a influência da temperatura sobre o crescimento e metabolismo de Bromeliaceae.

A micropropagação de plantas representa uma alternativa para a produção comercial de espécies de interesse econômico. Embora essa técnica tenha como desvantagem o custo elevado

para determinadas espécies, o valor comercial de um produto final selecionado e uniforme, bem como a possibilidade de produção em larga escala de plantas livres de doenças justificam sua utilização (Chu & Kurtz 1990). Devido à possibilidade de controlar a temperatura durante o cultivo *in vitro*, essa técnica torna-se importante ferramenta para o estudo da influência desse fator ambiental sobre a fisiologia das plantas.

Temperatura e desenvolvimento

A temperatura é um fator muito importante para a vida de todos os seres vivos, exercendo grande influência em todas as atividades fisiológicas, por controlar as taxas das reações metabólicas nas células. Especialmente para os vegetais, seres sésseis, as adaptações às alterações de temperatura devem ser rápidas e eficientes, para garantir sua sobrevivência (Browse & Xin 2001).

Calor e frio são estados termodinâmicos, caracterizados pela alta ou baixa energia cinética das moléculas. O calor acelera o movimento das moléculas, enfraquecendo as ligações entre elas e tornando as camadas lipídicas das biomembranas mais fluidas. A redução da temperatura leva a uma diminuição da velocidade de reações químicas vitais das plantas, além de tornar as biomembranas mais rígidas, sendo necessária maior quantidade de energia para ativar processos bioquímicos (Larcher 2006). O fato de a membrana tornar-se sólido-gel, com o abaixamento da temperatura, ocasiona aumento da permeabilidade, reduzindo a seletividade nos transportes das membranas, além de aumentar o valor da energia de ativação das enzimas ligadas a elas (Larcher 2006).

A influência da temperatura sobre a fisiologia das plantas tem sido demonstrada para vários órgãos e tecidos. As baixas temperaturas de outono freqüentemente causam a dormência de sementes, gemas ou órgãos subterrâneos, enquanto as temperaturas baixas do inverno contribuem para a quebra de dormência desses mesmos órgãos (Salisbury & Ross 1991). Em relação às folhas,

Majada *et al.* (2000) citaram que embora as características anatômicas sejam determinadas geneticamente, as condições ambientais têm forte influência sobre a estrutura destas. Perez *et al.* (2001) verificaram que a diminuição da temperatura de 25 °C para 12 °C acarretava inibição do crescimento (expresso em área foliar) de plantas de *Festuca arundinacea*. Em relação às raízes, Clarkson *et al.* (1986) reportaram que essas eram formadas em menor número em plantas de *Lolium perene* cultivadas sob temperaturas inferiores a 25 °C, quando comparadas às crescidas em temperaturas superiores a essa. Esse resultado foi relacionado ao fato de que à medida que a temperatura aumentava o número de raízes, havia um incremento no processo de absorção de nutrientes, intensificando o crescimento das plantas.

Alterações da temperatura ambiental influenciam sensivelmente o crescimento das plantas. Mudanças em poucos graus ocorridas no ambiente natural geralmente levam a alterações significativas nas taxas de crescimento, sendo a temperatura mínima definida como aquela abaixo da qual não há crescimento; temperatura ótima, aquela onde o crescimento atinge a máxima taxa e temperatura máxima, o valor de temperatura acima do qual não há crescimento e a planta pode morrer. Além disso, diferentes tecidos de uma mesma planta também podem apresentar diferentes temperaturas cardinais (Salisbury & Ross 1991).

Coutinho & Schrage (1970), já haviam salientado o possível significado das temperaturas noturnas sobre a distribuição geográfica e ecológica de grande parte de espécies de Bromeliaceae, cujos representantes rupícolas, por exemplo, estão expostos a grande luminosidade diurna e apresentam facilidade de perder calor durante o período noturno. Com isso, essas plantas são expostas a uma nítida e pronunciada alternância de temperatura entre dia e noite, sendo essa queda de temperatura noturna um fator que favorece a assimilação de CO₂ neste período. Assim, é possível entender melhor a maior riqueza em espécies e gêneros dessa família em regiões de clima úmido e mais frio, como acontece na Floresta Atlântica do sul do Brasil e nas zonas de maior altitude, ou de clima semi-árido com noites frias.

Em 85% das Angiospermas, a fixação do carbono em compostos orgânicos ocorre pela via C_3 . Este ciclo C_3 é plenamente ativo em presença de luz e inativo no escuro (Majerowicz 2008). C_4 são plantas predominantemente tropicais e subtropicais ocorrendo em menos de 1% das Angiospermas (Smith 1998 *apud* Majerowicz 2008), como milho, sorgo e cana-de-açúcar, entre outras culturas. CAM é um mecanismo fotossintético concentrador de CO_2 e foi selecionado possivelmente em resposta à aridez de ambientes terrestres e à limitação na disponibilidade de CO_2 em ambientes aquáticos. Bromeliaceae e Orchidaceae epífitas de ecossistemas áridos ou de florestas tropicais apresentam numerosos representantes com metabolismo CAM (Majerowicz 2008).

As plantas CAM são caracterizadas pela fixação maciça de CO_2 no período noturno. O CO_2 fixado é acumulado nos vacúolos na forma de malato, contribuindo para a acidez celular. Durante o dia, os estômatos se fecham, e o CO_2 para o ciclo C_3 passa a ser fornecido pela descarboxilação do malato. Durante a noite o amido produzido e acumulado é hidrolizado para a produção de PEP, acumulando-se de dia como produto da fotossíntese e da descarboxilação do malato (Majerowicz 2008).

O mecanismo de carboxilação das plantas CAM e C_4 é o mesmo, diferenciando-se quanto à regulação. Nas C_4 há uma separação anatômica entre a carboxilação pela PEPcase e o ciclo C_3 , processos que transcorrem simultaneamente. Já nas plantas CAM, a separação desses eventos é apenas temporal, ocorrendo na mesma célula fotossintética. A fixação do CO_2 atmosférico pela PEPcase nas plantas CAM se processa à noite, enquanto a fixação de CO_2 pelo ciclo C_3 ocorre durante o dia. Isso aumenta a eficiência do uso de água, pois a fixação noturna de CO_2 tem como resultado a diminuição da perda de água uma vez que a diferença de pressão de vapor da água entre as folhas e a atmosfera atinge valores mínimos durante a noite (Majerowicz 2008).

Segundo Martin (1994), a fotossíntese é ótima quando as temperaturas diurnas são amenas e as noturnas, levemente mais baixas. Temperaturas constantes reduzem a absorção de CO_2 no

período noturno. Na bromélia *Ananas comusus* a máxima atividade fotossintética aparentemente ocorre em regime de temperatura alternada de 30 °C (dia) e 15 °C (noite) (Martin 1994). Ainda para essa mesma espécie, Bartholomew & Kadzimin (1977) relataram que ocorrem alterações nas taxas de crescimento e desenvolvimento em resposta a mudanças de temperatura. Esses autores informaram também que em *A. comusus* var. Smooth Cayenne ocorria diminuição de massa seca quando as plantas eram cultivadas em temperatura mais altas (de 16,5% de massa seca em plantas cultivadas em 15 °C para 12,5% em 30 °C). Mais recentemente, Nievola *et al.* (2005) reportaram que plantas de *A. comusus* clonadas e cultivadas *in vitro* apresentavam diminuição no crescimento quando mantidas sob termoperíodos (28 °C claro/15 °C escuro) em relação àquelas mantidas a 28 °C constante, ambas sob fotoperíodo de 12 horas. Esses autores mostraram também que a morfologia externa e interna das plantas era alterada, dependendo da temperatura de cultivo, sendo que nas plantas mantidas a 15 °C durante o período escuro, as folhas eram mais espessas, menores e com maior conteúdo de massa seca, em comparação àquelas cultivadas a 28 °C. Esse resultado foi associado ao aumento no número de camadas de células nas plantas cultivadas sob temperaturas mais baixas e à ocorrência do metabolismo CAM nessa espécie, que também variava de acordo com a temperatura de cultivo. Plantas CAM são capazes de sobreviver em condições de falta de água, bem como em ambientes com elevada energia luminosa e grande amplitude térmica (Kluge & Ting 1978). De acordo com Dodd *et al.* (2002) há uma expressiva plasticidade genotípica e fenotípica nos padrões de expressão de CAM e essas variações são mediadas em parte por fatores ambientais, como a temperatura, por exemplo, além de sinalizadores moleculares.

A adaptação das plantas a diferentes temperaturas pode estar relacionada a variações nas concentrações de vários compostos, incluindo-se os carboidratos (Salisbury & Ross 1991, Larcher 2006). Vaz *et al.* (2004) avaliaram os efeitos da temperatura no crescimento e formação da flor em plantas de *Psychomorphis pusilla* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro* e suas relações com os níveis de carboidratos, clorofila e carotenóides. Esses autores mostraram que em *P. pusilla*, a melhor

qualidade das plantas era obtida quando a temperatura de cultivo era mantida a 27 °C, que é próxima à temperatura da região tropical do Brasil onde esta espécie ocorre naturalmente. Também é interessante destacar que temperaturas constantes de 22 °C e 32 °C (temperaturas mínima e máxima do local de origem desta espécie) foram negativas para o crescimento *in vitro* dessas plantas. Estes autores sugeriram que parece ser necessário haver diferentes temperaturas dia/noite para ocorrer melhor crescimento e desenvolvimento dessa espécie e que sob altas temperaturas haveria aumento da respiração e redução da absorção de CO₂, resultando na diminuição da produção de carboidratos, inibindo o crescimento e a floração, como foi sugerido por Chen *et al.* (1994), trabalhando com plantas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*.

A resistência ao frio é regulada tanto pela qualidade como pela quantidade de açúcares presentes nos vários estágios de desenvolvimento de plantas de *Ocimum nudicaule* (Figueiredo-Ribeiro 1980). Assim, além da redução do crescimento, outras características têm sido correlacionadas à tolerância ao frio, como o aumento de carboidratos solúveis (Ali *et al.* 1996, Gupta & Kaur 2005). Segundo Yoshioka *et al.* (1988), no inverno, ocorre aumento da atividade de enzimas como a amilase e o amido é convertido em carboidratos solúveis que possuem uma função importante na resistência ao frio, além de prover energia e substrato para o crescimento inicial dos ramos na primavera.

Para tolerar o frio, algumas plantas acumulam carboidratos e proteínas que estabilizam as membranas celulares durante a desidratação induzida por temperaturas baixas. Por exemplo, plantas de trigo acumulam sacarose sob baixas temperaturas e outros cereais de inverno também acumulam açúcares solúveis nas células nessas condições, inibindo a formação de cristais de gelo (Taiz & Zeiger 2004).

Hurry *et al.* (1995) propõem que o acúmulo de açúcares solúveis representaria um mecanismo de adaptação das plantas ao frio, maximizando a síntese de compostos com importantes funções associadas à manutenção do metabolismo basal durante o resfriamento. Do

ponto de vista fisiológico, açúcares como os frutanos parecem estar associados à proteção das plantas contra o frio e a seca, por atuarem na regulação osmótica da célula (Van den Ende *et al.* 2002). As adaptações das plantas ao resfriamento podem estar associadas à manutenção da estrutura da membrana plasmática, já que esta organela pode ser prejudicada caso essa adaptação não ocorra (Taiz & Zeiger 2004).

Carboidratos e temperaturas baixas

Os carboidratos são a principal fonte de energia para os seres vivos. Através do fluxo de energia solar, canalizado pela fotossíntese, compostos com baixo nível de energia são convertidos em compostos ricos em energia, como os carboidratos, principalmente sacarose e amido, que são os produtos mais estáveis do processo fotossintético (Majerowicz 2008).

Os carboidratos são classificados em função do número de átomos de carbono que possuem, podendo ser apresentados sob a forma de mono, di, oligo ou polissacarídeos. Os monossacarídeos, como a glicose, a frutose e a galactose, são formados por uma única unidade. A sacarose, que é um dissacarídeo, é o açúcar mais abundante e universal das plantas, devido à sua estabilidade estrutural e solubilidade em água, que o tornam o principal carboidrato translocável nas plantas (Taiz & Zeiger 2004).

Os α - galactosídeos derivados da sacarose são os mais comuns do reino vegetal e os mais abundantes e só perdem em importância para a sacarose. O grupo mais numeroso é o da família da rafinose (RFO), que são açúcares não redutores de peso molecular baixo, solúvel em água e álcool e incluem os α – galactosídeos estaquiose, verbascose, ajugose e outras cadeias maiores de oligossacarídeos até nonassacarídeos (Kadlec 2001). Os oligossacarídeos rafinose e estaquiose são encontrados em quase todas as partes das plantas de muitas espécies, principalmente em órgãos de reserva e em folhas. São sintetizados a partir da adição de moléculas de galactose à molécula de sacarose, podendo ser hidrolizados pela ação da α -galactosidase. Estes açúcares, assim como a

sacarose, atuam como compostos de reserva de rápida disponibilidade para a planta, como pode ser observado no processo de germinação, onde a rafinose é um dos primeiros compostos metabolizados (Bewley & Black 1985).

Entre os polissacarídeos, o amido é o maior carboidrato de reserva das plantas superiores, sendo acumulado em forma de grânulos depositados em diferentes órgãos da planta, especialmente em órgãos de reserva. O amido tem grande importância nutricional e industrial, sendo abundante em grãos de cereais, raízes tuberosas e tubérculos (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 2008). Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α (1-4), originando uma cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α (1-4) e α (1-6), formando uma estrutura ramificada. Embora a amilose seja definida como linear, atualmente se admite que algumas de suas moléculas possuem ramificações, semelhantes à amilopectina (Kadlec 2001). Outro polissacarídeo onipresente no reino vegetal é a celulose, que apresenta como monômeros a β -glicose e possui função estrutural, formando as paredes celulares.

Embora o mecanismo que regula a necessidade de temperaturas baixas não seja bem conhecido, sabe-se que freqüentemente ocorre conversão de polissacarídeos em açúcares livres em plantas com órgãos de reserva, quando essas são submetidas a temperaturas baixas (Charles-Edwards & Rees 1974).

O alto conteúdo de açúcares solúveis sob baixas temperaturas parece proteger o órgão contra o congelamento; assim a necessidade de um período de frio para hidrólise e mobilização de açúcares necessários ao crescimento, impede que as plantas tenham um grande desenvolvimento no outono, fato que lhes garante a sobrevivência no inverno (Charles-Edwards & Rees 1974).

Mudanças nas concentrações de açúcares solúveis foram interpretadas como uma resposta rápida de *Arabidopsis thaliana* à temperatura baixa, ocorrendo após duas horas de exposição das plantas a 1 °C (Wanner & Junttila 1999). Como essas mudanças precedem algumas alterações

mensuráveis de tolerância ao congelamento, não está claro se os açúcares estão relacionados à aclimação ao frio ou se agem indiretamente como fonte de energia para subseqüentes mudanças metabólicas que levam à tolerância ao congelamento (Klotke *et al.* 2004).

A cultura de tecidos tem sido apontada como um valioso instrumento para o estudo do metabolismo primário e secundário, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos importantes, dentre eles os carboidratos solúveis e suas enzimas associadas (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1992). Nessas condições, os carboidratos foram considerados de importância primordial para o desenvolvimento das plantas (Romano *et al.* 1995), por desempenhar papel não apenas como substrato para o crescimento, mas também afetando a diferenciação e o ciclo celular. Há evidências de que a sacarose, em particular, regula o metabolismo celular, atuando no nível da expressão gênica (Koch 1996). Foi demonstrado, também, que a sacarose exógena em baixas concentrações age como substrato para alterações metabólicas induzidas pela temperatura baixa, enquanto que em altas concentrações esse açúcar tem um efeito crioprotetor das membranas celulares (Uemura & Steponkus 2003).

Desde a década de 50 do século passado sabe-se que as temperaturas baixas estimulam a redução do teor de amido e o aumento de açúcares em plantas e que este aumento parece estar associado à tolerância ao frio em muitas espécies. Entretanto, a percepção e a transdução de sinais, a reprogramação da expressão gênica e do metabolismo e a reorganização de estruturas celulares, alterando o desenvolvimento vegetal em resposta a temperaturas baixas são processos complexos e multigênicos e que ainda precisam ser mais estudados (Kaplan *et al.* 2006).

As principais alterações metabólicas registradas durante a aquisição de tolerância ao frio incluem modificações nos ácidos nucléicos, carboidratos, proteínas, reguladores de crescimento e lipídios (Li 1984). Com relação aos carboidratos, foi verificado um acúmulo de rafinose em plantas de *Viola wittrochiana* aclimatadas ao frio (Stushnoff *et al.* 1998) e maior teor desse oligossacarídeo em mutantes de *Arabidopsis* tolerantes ao congelamento (Klotke *et al.* 2004). De

fato, os açúcares da série da rafinose parecem atuar como crioprotetores (Carpenter & Crowe 1988), sendo os responsáveis pela aquisição da tolerância ao congelamento em várias espécies (Bachmann *et al.* 1994, Pennycooke & Towill 2000, Taji *et al.* 2002).

De acordo com Van den Ende & Van Laere (1996) o aumento no conteúdo de oligossacarídeos em condições de estresse por temperaturas baixas no outono, em regiões de clima temperado, contribui para o aumento da resistência ao congelamento no inverno, o que pode estar diretamente relacionado ao efeito desses açúcares sobre a estabilização das membranas celulares (Hinch *et al.* 2002).

O papel dos polímeros de frutose (frutanos) na tolerância ao frio também vem sendo estudado extensamente nas últimas décadas e esses açúcares parecem atuar como reguladores osmóticos em condições de baixas temperaturas (Pontis & Del Campillo 1985, Spollen & Nelson 1994, Konstantinova *et al.* 2002). Em gramíneas de clima temperado os frutanos são acumulados durante a aclimação ao frio (Pollock & Cairns 1991), constituindo uma importante fonte de energia. Em *Vernonia herbacea*, uma Asteraceae do cerrado brasileiro, também houve acúmulo de fruto-oligossacarídeos no inverno (Carvalho & Dietrich 1993). O aumento da atividade da enzima que hidrolisa os frutanos no inverno, indica que os fruto-oligossacarídeos estão envolvidos na tolerância dessas plantas à baixa temperatura (Asega 2007). O efeito da baixa temperatura na composição de frutanos acumulados nos rizóforos dessa espécie já havia sido reportado anteriormente por Dias Tagliacozzo *et al.* (1999), havendo aumento no conteúdo desses compostos ao final do tratamento a 5 °C, em comparação com plantas mantidas a 25 °C. Bulbos de *Allium cepa* (Liliaceae) armazenados sob temperaturas baixas também apresentaram redução no conteúdo de fruto-polissacarídeos, que foram hidrolisados nessas condições, produzindo oligossacarídeos e frutose, conforme comentado por Benkeblia *et al.* (2005).

Justificativas e hipótese

Estudos prévios (C. Nievola, comunicação pessoal) mostraram que a viabilidade das sementes de *Alcantarea imperialis* é drasticamente diminuída quando armazenadas a 10 °C por períodos superiores a 12 meses, prejudicando a obtenção de plântulas e diminuindo as possibilidades de preservação da espécie via banco de sementes (Machado *et al.* 2005). Portanto, torna-se necessário o estudo de outros métodos de conservação dessa espécie com vistas a diminuir o crescimento das plântulas, sem comprometer a sobrevivência destas. Assim, a manutenção de culturas com crescimento lento induzido por baixas temperaturas pode ser uma alternativa ao banco de sementes, quando há perda de viabilidade destas sob armazenamento prolongado (Mercier & Nievola 2001).

O estudo da influência da temperatura em plantas cultivadas *in vitro*, além de permitir o controle das variáveis que se pretende avaliar, pode contribuir para a geração de conhecimentos de modo a viabilizar a formação de coleções sob crescimento lento, diminuindo a necessidade de subcultivos (Islam *et al.* 2005). De acordo com Sarasan (2006), por meio dessa técnica é possível preservar espécies ameaçadas de extinção.

São conhecidos alguns métodos que utilizam a temperatura baixa como recurso para a conservação de espécies vegetais, como o crescimento lento *in vitro* e a criopreservação. O crescimento lento *in vitro* a partir de sementes utilizando a temperatura baixa provoca redução do metabolismo, sem afetar a viabilidade, sendo a melhor alternativa aos bancos de sementes que apresentam curta viabilidade, como já mencionado anteriormente. O cultivo *in vitro* a partir de sementes tem sido indicado a programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção, pois permite a manutenção da variabilidade genética. A criopreservação, utilizando a temperatura de – 196 °C em nitrogênio líquido para a inativação completa de todos os processos metabólicos (Withers & Williams 1998), também tem sido recomendada para os mesmos fins. Contudo, segundo Pierik (1987), para plantas tropicais, o limite superior de temperaturas baixas é de 15 °C,

razão pela qual foi escolhida esta temperatura para se iniciar o estudo da fisiologia do crescimento de *Alcantarea imperialis* cultivada *in vitro*, visando à preservação dessa espécie ameaçada de extinção.

Poucos trabalhos citam a utilização de temperaturas inferiores a 25 °C no cultivo *in vitro* de bromélias ameaçadas, como por exemplo, *Dyckia distachya* (Pompelli & Guerra 2004), *Dyckia encholirioides* (Pompelli *et al.* 2006) e *Tillandsia eizii* (Pickens *et al.* 2003). De acordo com a maioria desses trabalhos, as culturas eram mantidas em salas climatizadas, com temperaturas variando ao redor de 26 °C.

Considerando o fato de que o ambiente em que *Alcantarea imperialis* se desenvolve na natureza inclui drásticas variações térmicas ao longo do dia, torna-se interessante comparar o crescimento de plantas dessa espécie cultivadas *in vitro* sob diferentes regimes térmicos (30 °C, 30 °C/15 °C, 15 °C). Ainda, a comparação com o crescimento de plantas mantidas em condições de sala climatizadas, usualmente utilizada para a produção de bromélias, também se faz necessária. Como alternativa ao cultivo *in vitro*, muitos produtores de bromélias utilizam estufas. Assim, a comparação do crescimento de plantas cultivadas *in vitro* com aquelas crescidas em estufa também poderá constituir um importante parâmetro, quando se tem em vista a transferência e a aclimação das plantas produzidas *in vitro* para as condições de estufa (Campostrini & Otoni 1996, West & Preece 2006).

Como já enfatizado, os carboidratos podem ser acumulados em resposta a estresses ambientais, especialmente o frio e a seca, atuando como crio- ou osmoprotetores celulares (Leslie *et al.* 1995). Sendo assim, torna-se interessante avaliar se ocorrem alterações quantitativas e qualitativas nos carboidratos não estruturais de plantas de *A. imperialis* cultivadas sob diferentes temperaturas, incluindo temperatura baixa. Uma vez que essas plantas em condições naturais estão submetidas a amplas variações de temperatura em curto intervalo de tempo, como já mencionado,

a análise desses compostos poderia indicar se os mesmos estariam envolvidos na proteção das plantas nessas condições.

Objetivos

Este trabalho teve por objetivos analisar o crescimento, o conteúdo e a composição de carboidratos não estruturais em plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* sob diferentes regimes de temperatura e compará-los aos de plantas cultivadas em condições *ex vitro*. Além de fornecer informações fundamentais para a preservação dessa espécie, esse trabalho poderá contribuir para a ampliação do conhecimento sobre o papel dos carboidratos no desenvolvimento e na proteção de plantas sob condições de temperaturas baixas.

Literatura citada

- Ali, I. A., Kafkafi, I., Yamaguchi, Y., Sugimoto, Y. & Inanaga, S.** 1996. Effects of low root temperature on sap flow rate, soluble carbohydrates, nitrate contents and on cytokinin and gibberellin levels in root xylem exudate of sand-grown tomato. *Journal of Plant Nutrition* 19: 619-634.
- Andreas, K.** 2006. Growing *Alcantarea* Species: Illustrating Terrie Bert's Article. Newsletter of the Bromeliad Society of Central Florida 32 (02) <http://fcbs.org/newsletters/BSCF/022006.pdf> consultado em 16/12/2008.
- Asega, A. F.** 2007. Mobilização de frutanos durante a brotação em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby: purificação e expressão gênica de frutano-exohidrolases. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Bachmann M., Matile, P. & Keller, F.** 1994. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans*: cold acclimation, translocation and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme. *Plant Physiology* 105:1335-1345.
- Bartholomew, D. P. & Kadzimin, S. B.** 1977. Pineapple. In: Alvin, P.T. & Kozeowski, T.T. *Ecophysiology of tropical crops*. Academic Press, USA. p. 113-156.
- Benkeblia, N., Onodera, S. & Shiomi, N.** 2005. Variation in 1-fructo-exohydrolase (1-FEH) and 1-kestose-hydrolysing (1-KH) activities and fructo-oligosaccharide (FOS) status in onion bulbs. Influence of temperature and storage time. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 227-234.
- Benzing, D. H.** 2000. *Bromeliaceae - Profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press, UK. 690p.
- Bewley, J.D. & Black, M.** 1985. *Seeds: physiology of development and germination*. New York: Plenum Press, 367p.

- Browse, J. & Xin, Z.** 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 241-246.
- Campostrini, E. & Otoni, W. C.** 1996. Aclimação de Plantas: abordagens recentes. *ABCTP Notícias* n. 25. 12 p.
- Carpenter J. F. & Crowe J. H.** 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25: 244-255.
- Carvalho, M. A. M. & Dietrich, S. M.** 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Charles-Edwards, D.A. & Rees, A. R.** 1974. A simple model for the cold requirement of Tulip. *Annals of Botany* 38: 401-408.
- Chen, W. S., Liu, H.Y., Liu, Z. H., Yang, L., Chen, W. H.** 1994. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. *Physiologia Plantarum* 90: 391-395.
- Chu, I. Y. E. & Kurtz, S. L.** 1990. Commercialization of plant micropropagation. Pp 126-164. In: P.V. Ammirato; D.A. Evans; W.R.Sharp & Y.P.S. Bajaj (eds). *Handbook of Plant Cell Culture*. New York, McGraw Hill.
- Clarkson, D. T., Hopper, M. J. & Jones, L. H. P.** 1986. The effect of root temperature on the uptake of nitrogen and the relative size of the root system in *Lolium perenne*. I. Solutions containing both NH_4^+ and NO_3^- . *Plant, Cell and Environment* 9:535-545.
- Coutinho, L. M. & Schrage, C. A. F.** 1970. Sobre o efeito da temperatura na ocorrência de fixação noturna de CO_2 em Orquídeas e Bromélias. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 42 (4): 843-849.
- Cronquist, A.** 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York.

- Dahlgren, R. M. T., Clifford, H. T. & Yeo, P. F.** 1985. The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Dias-Tagliacozzo, G. M., Itaya, N. M., Carvalho, M. A. M., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. & Dietrich, S. M. C.** 1999. Fructans and water suppression on intact and fragmented rhizophores of *Vernonia herbacea*. Brazilian Archives of Biology and Technology 47:363-373.
- Dietrich, S. M., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Chu, E. P. & Buckeridge, M. S.** 1988. O açúcar das plantas. Ciência Hoje 7(39):12-18.
- Dodd, A. N., Borland, A. M., Haslam, R. P., Griffiths, H. & Maxwell, K.** 2002. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. Journal of Experimental Botany 53(359): 569-580.
- Duran, S. & Monteiro, K.** 2001. Jardim de luxo sustenta tráfico de plantas. Folha de São Paulo(SP).
- Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1980. Variações fisiológicas e metabólicas no xilopódio de *Ocimum nudicaule* Benth. var. *anisifolium* Giul. em diferentes estádios fenológicos. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Dietrich, S. M. C., Carvalho, M. A. M., Vieira, C. C. J., Dias-Tagliacozzo, G. M. & Tertuliano, M. F.** 1992. As múltiplas utilidades dos frutanos. Ciência Hoje 14: 16-18.
- Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Chu, E. P. & Almeida, V. P.** 2008. Tuberização. Pp. 409-419 In Fisiologia Vegetal - 2a. Edição (G. B. Kerbauy, Ed.). Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro (RJ), 431p.
- Gilmartin, A. J.** 1973. Transandean distributions of Bromeliaceae in Ecuador. Ecology 54: 1389-1393.

- Gupta, A. K. & Kaur, N.** 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences*. 30: 761-776.
- Hincha, D. K., Zuther, E., Hellwege, E. M. & Heyer, A. G.** 2002. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* 12: 103-110.
- Hurry, V. M., Keerberg, O., Pärnik, T., Gardeström, P. & Gunnar, O.** 1995. Cold-hardening results in increased activity of enzymes involved in carbon metabolism in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.). *Planta* 195: 554-562.
- Islam, M. T., Dembele, D. P. & Keller, E. R. J.** 2005. Influence of 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.
- Kadlec, P.** 2001. Carbohydrates in grain and legume seeds. Ed. C.L. Hedley 2: 15-59.
- Kaplan F., Sung D.Y. & Guy C.L.** 2006. Roles of β - amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum* 126: 120-128.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N. & Heyer, A. G.** 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment* 27: 1395-1404.
- Kluge, M. & Ting, I. P.** 1978. Crassulacean acid metabolism. Analysis of an Ecological Adaptation. Springer-Verlag Berlin – Heidelberg, Germany. 209p.
- Koch, K.E.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540.

- Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanasov, A. & Djilianov, D.** 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* 163: 157-164.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia Vegetal RiMa*, São Carlos, SP, 398p.
- Leme, E. M. C & Marigo, L. C.** 1993. *Bromélias na natureza*. Marigo Comunicação Visual Ltda. Rio de Janeiro. 183p.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighrheart, B., Crowe, J. H. & Crowe, L. M.** 1995. Threalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3592-3597.
- Li, P.H.** 1984. Subzero temperature stress physiology of herbaceous plants. *Horticulture Review* 6: 373–416.
- Luther, H. E.** 2004. An alphabetical list of Bromeliad Binomials, 9th ed. The Bromeliad Society International, Sarasota.
- Machado, B. M., Almeida, M. C., Nievola, C. C., Kanashiro, S. & Tamaki, V.** 2005. Obtenção de plântulas de bromélias a partir de sementes armazenadas a 10° C. In: 56 ° Congresso Nacional de Botânica, 2005, Curitiba. *Anais do 56° Congresso Nacional de Botânica*, 2005.
- 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.
- Majerowicz, N.** 2008. Fotossíntese. pp.82-133. in Kerbauy, G.B. *Fisiologia Vegetal – 2ª. ed.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Martin, C. E.** 1994. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. *The Botanical Review* 60(1): 1-82.

- Medina, E.** 1974. Dark CO₂ fixation, habitat preference and evolution within the Bromeliaceae. *Evolution* 28:677-686.
- Mercier, H. & Nievola, C. C.** 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1: 57-62.
- Moreira, B. A.** 2002. *Nidularium* Lem. (Bromelioideae: Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Museo Nacional/ Programa de Pós- Graduação em Ciencias Biológicas (Botânica). 73p.
- Naves, V.C.** 2001. Propagação *in vitro* de Bromélia Imperial (*Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Lavras:UFLA. Dissertação (Mestrado), 76p.
- Nievola, C.C., Mercier, H., Majerowicz, N.** 2001. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of Plant Nutrition* 24:1387-1398.
- 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 grown *in vitro*. *In Vitro Plant Cellular & Developmental Biology* 41: 832-837.
- Nunes, J. V. C. & Forzza, R. C.** 1998. Bromélias. Projeto: Inventário dos recursos naturais da Mata Atlântica, São Paulo, Vol. 1, N.1.
- Pennycooke, J. C. & Towill, L. E.** 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) by vitrification. *Plant Cell Reports* 19: 733-739.
- Perez, P., Morcuende, R., Molino, I. M., Puente, L. S. & Martinez-Carrasco, R.** 2001. Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clover. *Physiologia Plantarum* 112: 478-486.
- Pickens, K. A., Affolter, J. M. & Wetzstein, H. Y.** 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. *HortScience* 38: 101-104.

- Pierik, R. L. M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 343 p.
- Pollock, C. J. & Cairns, A. J.** 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Molecular Biology* 42:77–101.
- Pompelli, M. F. & Guerra, M. P.** 2004. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4: 273-279.
- Pompelli, M. F., Fernandes, D. & Guerra, M. P.** 2006. Germination of *Dyckia encholirioides* (Gaudichaud) Mez var. *Encholirioides* under saline conditions. *Seed Science and Technology* 34:759-763.
- Pontis, H. G. & Del Campillo, E.** 1985. Fructans. In P.M. Dey & R.A. Dixon (eds). *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, Academic Press, New York, pp. 205-226.
- West, T. P. & Preece, J. E.** 2006. Use of acetate, benomyl and alginate encapsulation for eliminating culture mites and fungal contamination from *in vitro* cultures of hardy hibiscus (*Hibiscus moscheutos* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*. 42(3): 301-304.
- Reitz, R.** 1983. Bromeliáceas e a Malária – Bromélia Endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense*, v. Brom. Herbário “Barbosa Rodrigues”, Itajaí, pp. 1-559.
- Rodrigues, T. M., Paiva, P. D. O., Rodrigues, C. R., Carvalho, J. G., Ferreira, C. A. & Paiva, R.** 2004. Desenvolvimento de mudas de Bromélia Imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. *Ciência Agritecnológica*, Lavras, 28(4): 757-763 .
- Romano, A., Noronha, C. & Martins-Loução, M. A.** 1995. Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40: 159-167.
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W.** 1991. *Plant Physiology*. 4th ed. California; Wadsworth Publishing Company, 682p.

- Sarasan, V. A., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., Rowntree, J. K.** 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In vitro Cell Developmental Biology – Plant* 42:206-214.
- Smith, L. B. & Downs, R. J.** 1974. Pitcairnioidea (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 1-658.
- Spollen, W. G. & Nelson, C. J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Stushnoff, C., Seufferheld, M. J. & Creegan, T.** 1998. Oligosaccharides as endogenous cryoprotectants in woody plants. In: P.H. Li & T.H.H. Chen (eds.). *Plant Cold Hardiness: Molecular Biology, Biochemistry and Physiology*. Plenum Press, New York, pp.302-309.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. *Plant Physiology* – 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, MA, USA. 792 p.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kobayashi, M., Yamagushi-Shinozaki, K. & Shinnozaki, K.** 2002. Important roles of drought and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29: 417-426.
- Uemura, M. & Steponkus, P. L.** 2003. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment* 26:1083-1096.
- Van Den Ende, W. & Van Laere, A.** 1996. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van Den Ende, W., Michiels, A., Roover, J. & Van Laere, A.** 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* 2: 1281-1295.
- Vaz, A. P. A., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Kerbaudy, G. B.** 2004. Photoperiod and

temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. Plant Physiology and Biochemistry 42: 411-415.

Wanner, L. A. & Juntilla, O. 1999. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. Plant Physiology 120: 391-399.

Withers, L. A., Williams, J. T. 1998. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: Torres *et al.* (ed.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA, vol.1, p. 297-330.

Yoshioka, H., Nagai, K. & Fukumoto, M. 1988. Seasonal changes of carbohydrates metabolism in apple trees. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 36:219-227.

http://www.biodiversitas.org.br/florabr/lista_florabr.pdf . Acesso em 16 de dezembro de 2008.

<http://www.biodiversityreporting.org/article.sub?docId=232&c=Brazil&cRef=Brazil&year=2001>.

Acesso em 25 de novembro de 2008.

Efeito da temperatura no crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*

RESUMO – (Efeito da temperatura no crescimento de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*). As bromeliáceas destacam-se entre as principais plantas ornamentais tropicais e seus representantes apresentam grande plasticidade em relação ao ambiente, como é o caso de *Alcantarea imperialis*, nativa da Mata Atlântica, que cresce sobre rochas ou solos rasos e pedregosos em regiões com temperaturas médias de 19 °C, que podem oscilar entre 5 e 40 °C em um único dia. Dentre os fatores ambientais, a temperatura é crucial para o desenvolvimento das plantas, afetando todos os processos fisiológicos e metabólicos. Considerando que o crescimento de plantas pode ser drasticamente diminuído sob baixas temperaturas, o objetivo deste trabalho foi analisar o crescimento inicial de plantas de *A. imperialis* cultivadas sob diferentes condições térmicas, a partir de sementes germinadas *in vitro*, em câmaras de germinação a 15 °C, 15/30 °C (termoperíodo escuro/claro) e 30 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Para comparação, um lote controle foi mantido *in vitro* em sala de cultura a 26 °C e outro em estufa, utilizando casca de pinus como substrato. Foi avaliado o tempo de emergência das plântulas e após 3, 6 e 9 meses de cultivo foram determinados o número, o comprimento e as massas fresca e seca da parte aérea e da radicular. Os resultados indicaram que foram necessários 50 dias para ocorrer emergência de 80% das plântulas provenientes de sementes mantidas a 15 °C, 21 dias para as de termoperíodo e 14 dias para as de 30 °C. As plantas mantidas por 9 meses a 15 °C apresentaram folhas e raízes em número e tamanho reduzidos e menores valores de massas fresca e seca, sendo em média 4 vezes inferiores às de 30 °C. As plantas cultivadas sob termoperíodo apresentaram valores intermediários. Os resultados permitiram concluir que as temperaturas baixas limitaram o crescimento *in vitro* de *A. imperialis* sem, contudo, alterar o crescimento e a sobrevivência das plântulas, podendo esta técnica ser utilizada como estratégia para a preservação da espécie, alternativamente aos bancos de sementes.

Palavras-chave: Bromeliaceae, crescimento, cultivo *in vitro*, temperaturas baixas

ABSTRACT – (Effect of temperature on growth of *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultured *in vitro*). The Bromeliaceae is included among the main tropical ornamental plants and presents a great plasticity in relation to the environment, as is the case of *Alcantarea imperialis*, native from the Atlantic Rainforest, growing on rock mountains or stony soils in regions of average temperatures of 19 °C, that can oscillate from 5 to 40 °C in just one day. Among the environmental factors, the temperature is crucial for the plant development, affecting all physiological processes and metabolism. Considering that plant growth can be drastically reduced under low temperatures, the aim of this work was to analyze the development of *A. imperialis* plants grown under different temperatures, from seeds germinated *in vitro* in growth chambers at 15 °C, 15/30 °C (dark/light thermoperiod) and 30 °C, under 12 h photoperiod. A control lot was maintained *in vitro* in a culture room under 26 °C and another in a greenhouse, using pinus cork as substrate. The time of emergency of the plantlets was evaluated and after 3, 6 and 9 months of cultivation the number, length and fresh and dry masses of the aerial parts and of the root system were determined. The results indicated that there were necessary 50 days for emergency to occur in 80% of the plantlets maintained for 9 months under 15 °C, 21 days for the ones cultivated under thermoperiod and 14 days for the ones at 30 °C. The plants maintained for 9 months under 15 °C presented leaves and roots in reduced number and size and low values of fresh and dry masses, being in average 4 times lower than the ones at 30 °C. The plants grown under thermoperiod presented intermediate values. These results allowed concluding that low temperatures limited the growth of *A. imperialis* cultured *in vitro* but did not affect the plantlet survival.

Keywords: Bromeliaceae, growth, *in vitro* culture, low temperatures

Introdução

Bromeliaceae é uma família de distribuição neotropical com 40 % de suas espécies existentes no território brasileiro. Cerca de 80% ocorrem na Mata Atlântica, desde o nível do mar até altitudes bastante elevadas, em regiões com grandes amplitudes térmicas, como é o caso da Serra dos Órgãos (RJ), área com ecossistemas de Floresta Tropical e Campos de Altitude (Leme & Marigo 1993) e de onde é nativa *Alcantarea imperialis*. A bromélia imperial, como é popularmente conhecida esta espécie pelo seu valor ornamental, pode ser encontrada crescendo naturalmente sobre rochas ou solos rasos e pedregosos, em altitudes superiores a 800 metros, em regiões de clima mesotérmico brando, com temperaturas médias de 19 °C, que podem oscilar entre 40 °C e 5 °C em um único dia. A espécie deve apresentar grande plasticidade a variações de temperatura, tendo sido considerada por Andreas (2006) como tolerante ao frio.

A temperatura é um fator crucial para a vida dos seres vivos, pois controla as taxas em que ocorrem todas as reações metabólicas e por isso exerce influência nas atividades fisiológicas, especialmente nas plantas que são seres sésseis. Nestes, a adaptação às alterações de temperatura devem ser muito rápidas e eficientes, para garantir sua sobrevivência em situações desfavoráveis (Browse & Xin 2001).

A redução da temperatura leva à diminuição da velocidade das reações químicas, tornando as biomembranas mais rígidas e fazendo com que seja necessária maior quantidade de energia para ativar os processos biológicos. Como consequência, as membranas se tornam sólido-gel, ocasionando aumento da permeabilidade e reduzindo a seletividade, além de aumentar o valor da energia de ativação das enzimas a elas ligadas (Larcher 2006).

Segundo Salisbury & Ross (1991), o crescimento das espécies vegetais é adaptado às temperaturas de seu ambiente natural, sendo sensível a alterações da temperatura em poucos graus. Além disso, diferentes tecidos e órgãos de uma mesma planta podem ser afetados de forma

distinta pela temperatura. Esta, sabidamente, influencia todas as etapas do desenvolvimento vegetal, desde a germinação das sementes, alterando a velocidade e a porcentagem final do processo, afetando principalmente a absorção de água e todas as reações bioquímicas que caracterizam a germinação (Popinigis 1985).

O cultivo *in vitro* é um sistema adequado para se estudar os efeitos de fatores ambientais no crescimento, possibilitando a padronização de fatores abióticos, como a temperatura, e nutricionais, que afetam o desenvolvimento das plantas. Tem sido demonstrado que a redução do crescimento de plantas *in vitro*, com a finalidade de preservação e constituição de bancos de germoplasma, pode ser conseguida por meio da utilização de temperaturas baixas (Islam *et al.* 2005), como realizado para plantas de crisântemo (Pierik 1987), constituindo uma alternativa aos bancos de sementes. Segundo o mesmo autor, o limite superior de temperaturas baixas para plantas tropicais é de 15 °C, razão pela qual foi escolhida esta temperatura para se iniciar o estudo da fisiologia do crescimento de *Alcantarea imperialis* cultivada *in vitro*, apresentado neste trabalho.

As sementes de *Alcantarea imperialis* apresentam curta longevidade quando armazenadas a 10 °C (C.C. Nievola, comunicação pessoal), prejudicando sua preservação em bancos de sementes. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo analisar a influência da temperatura sobre o desenvolvimento de plantas dessa espécie durante o cultivo *in vitro*, com vistas a avaliar sua adaptação a condições que reduzam o crescimento, sem alterar o desenvolvimento e a sobrevivência, como uma alternativa aos bancos de sementes.

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal

Sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms foram obtidas de indivíduos da Coleção de Bromélias da Seção de Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo, no segundo semestre de 2006 (figura1). Os apêndices plumosos foram removidos e as sementes foram desinfestadas por imersão em etanol 70% durante 5 min, seguida de imersão em solução fungicida de benomyl (Benlat ®) a 0,1% por 20 min e posteriormente em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5%, contendo 5 gotas de Twin® 20 por uma hora, sempre com agitação contínua.

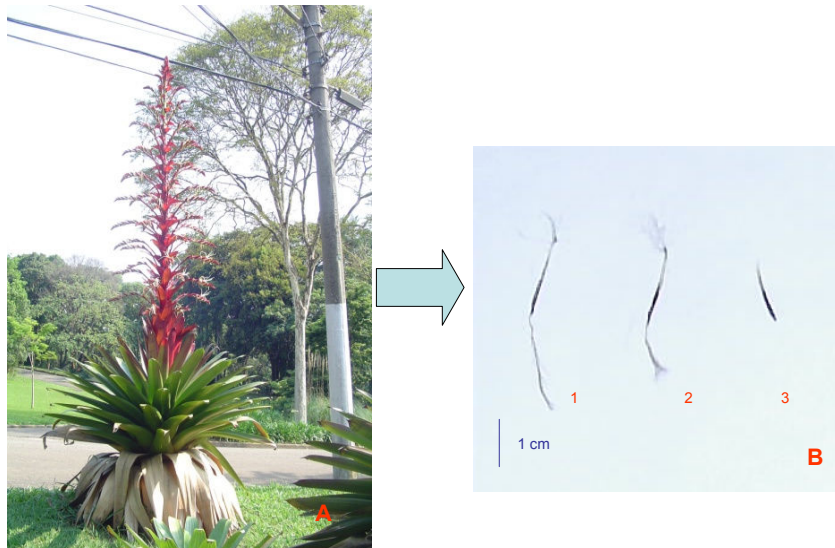


Figura 1. *Alcantarea imperialis* (A); sementes com apêndices plumosos (B – 1 e 2) e semente com apêndice plumoso removida (B - 3).

Condições de cultivo

Após a desinfestação, as sementes foram enxaguadas em câmara de fluxo laminar com água destilada e colocadas para germinar em placas de Petri (70 sementes por placa) contendo 10

mL de meio de cultura Murashige & Skoog (1962), esterilizado em autoclave, contendo a concentração de micronutrientes original e de macronutrientes reduzida à metade, adicionado de 100 mg/L de *myo*-inositol, 30 g/L de sacarose e 7 g/L de agar (Difco). O pH foi ajustado para 5,8.

Foram utilizadas cerca de 2000 sementes para cada tratamento, em câmaras de germinação do tipo BOD (FANEM) com temperaturas controladas a $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ constante, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ escuro/ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ claro e $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ constante, todas sob fotoperíodo de 12 horas ($30\text{ }\mu\text{moles m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Um lote também foi mantido em Sala de Cultura a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 horas ($45\text{ }\mu\text{moles m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) e outro de 500 sementes em câmara de germinação a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após a emergência das plântulas (considerada a partir da emissão da primeira folha), estas foram transferidas para frascos de vidro (15 plântulas por frasco) contendo 40 mL do meio de Murashige & Skoog (1962), com a concentração de macronutrientes reduzida à metade, sendo mantidas nessas condições por até 9 meses, com troca do meio de cultura após 5 meses de realizada a inoculação, para evitar deficiência nutricional. Paralelamente, foi preparado outro lote de 2000 sementes, desinfestadas como descrito previamente e depositadas em caixas do tipo Gerbox, com papel umedecido em água destilada e mantidas na Sala de Cultura a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 horas, sendo borrifada água destilada duas vezes por semana até a emergência das plântulas. Após esse período, as plântulas foram transferidas para bandejas de isopor contendo casca de *Pinus sp* fina como substrato (Jimenez & Caballero 1990). Este lote foi envolvido por saco plástico e regado uma vez por semana com solução nutritiva constituída pela concentração original de micronutrientes do meio de Murashige & Skoog (1962) e a concentração de macronutrientes reduzida à metade, e duas vezes por semana com água destilada, durante todo o período de análise (9 meses).

O desenho experimental para a análise de crescimento constou de cinco tratamentos, sendo três em câmaras de germinação (*in vitro*) e dois em Sala de Cultura sendo um *in vitro* e outro *ex*

vitro, dos quais foram retiradas amostras a cada 3 meses, totalizando 3 tempos de coleta e perfazendo um total de 15 amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Após as coletas, as plantas foram separadas em duas regiões, como está mostrado na figura 2, sendo uma constituída pelo sistema radicular e outra pelo eixo caulinar (contendo caule e folhas). Foram utilizadas 18 plantas para cada tratamento.

Os parâmetros biométricos avaliados do material coletado foram: número de folhas, número de raízes, comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz e massa fresca e seca das raízes, caules e folhas. A determinação da massa seca das amostras foi realizada em estufa a 60 °C até massa constante.



Figura 2. Partes das plantas de *Alcantarea imperialis* analisadas separadamente: eixo caulinar (A) e sistema radicular (B).

Resultados e Discussão

A temperatura é um fator ambiental crucial, que influencia a fisiologia e o metabolismo das plantas desde a germinação. As análises realizadas no presente trabalho permitiram avaliar que as sementes de *Alcantarea imperialis* não germinam quando mantidas por 90 dias *in vitro* em câmara de germinação a 5 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Contudo, ocorreu até 80% de germinação nos lotes mantidos *in vitro* a 30 °C e em Sala de Cultura a 26 °C, após 14 dias de cultivo. Para as sementes mantidas sob regime de alternância de temperatura (15 °C escuro/30 °C claro), foram necessários 21 dias para que a mesma porcentagem de germinação fosse atingida e cerca de 50 dias para as sementes mantidas a 15 °C (figura 3).

Esses dados indicaram uma relação inversa entre temperatura e tempo para ocorrer emergência das plântulas de *Alcantarea imperialis*, provavelmente relacionado à diminuição do metabolismo das sementes mantidas sob temperaturas baixas conforme reportado por Okusanya (1980) para *Celosia cristata* L., contudo, não houve redução da porcentagem final de emergência a 15 °C.

Segundo Larcher (2006), para as sementes serem capazes de germinar, suas temperaturas cardinais (temperaturas mínima, ótima e máxima de desenvolvimento) devem corresponder a condições externas que assegurem desenvolvimento suficientemente rápido para as plantas jovens. Após ser alcançado o limite mínimo de temperatura, a taxa de germinação aumenta exponencialmente com o aumento da temperatura. Há frequentemente uma relação ecológica entre a velocidade de germinação e as condições climáticas. Por exemplo, nas espécies que em condições naturais germinam no período de verão, a germinação ocorre de forma muito lenta em temperaturas baixas, havendo aceleração do processo somente após o substrato ter atingido mais de 10 °C. Dessa maneira, a sincronização é realizada de acordo com a estação do ano mais

favorável para o crescimento das plantas jovens, melhorando suas chances de sobrevivência e crescimento contínuo (Larcher 2006).

Alcantarea imperialis é uma espécie endêmica de região serrana, com temperaturas médias diárias de 19 °C, mas que variam muito ao longo de um mesmo dia (de 5 a 40 °C); portanto, a espécie parece apresentar grande plasticidade a variações de temperatura. Apesar do tempo de emergência das plântulas ter variado em função da temperatura, utilizada para o cultivo *in vitro* (entre 15°C e 30 °C), tornando-se maior em temperaturas mais baixas, a porcentagem final de emergência se manteve em 80 %. Isto pode indicar que os valores de temperatura utilizados neste experimento encontravam-se entre as temperaturas cardinais, enquanto que o valor de 5 °C estaria abaixo da temperatura mínima para esta espécie, uma vez que não houve germinação nesta condição térmica.

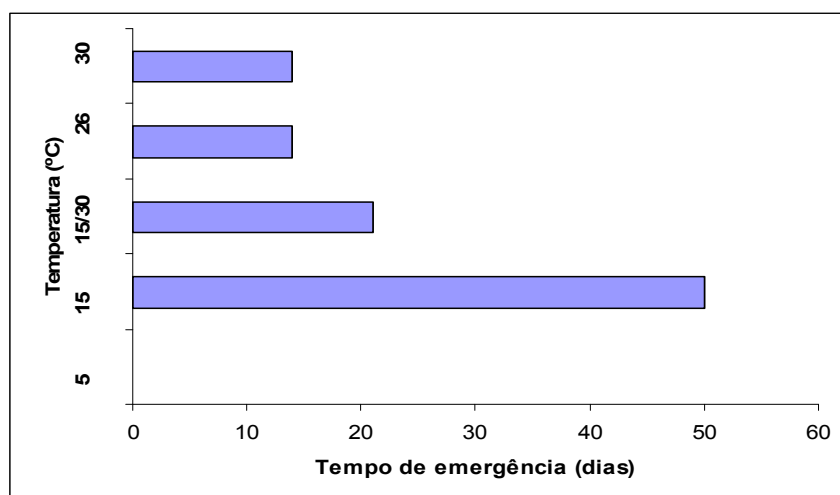


Figura 3. Número de dias necessários para emergência de 80% das plântulas de *Alcantarea imperialis* cultivadas sob diferentes tratamentos térmicos (Sala de cultivo a 26 °C $\pm$ 2 °C e BOD 15 °C, 15 °C/30 °C e 30 °C).

Após a emergência e transferência das plântulas para frascos de cultura, o crescimento foi analisado aos 3, 6 e 9 meses de cultivo, sendo os resultados mostrados nas figuras 4, 5 e 6. Como

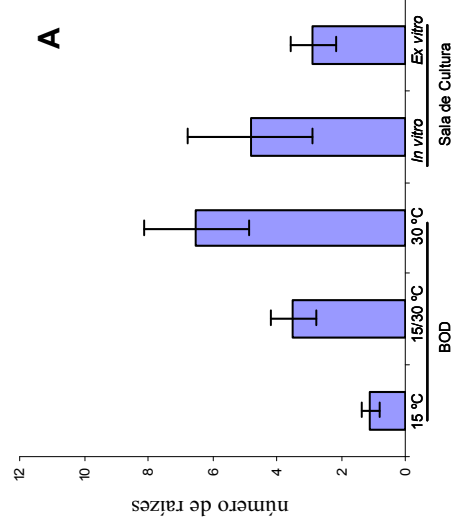
pode ser observado, a temperatura exerceu influência expressiva no crescimento de *Alcantarea imperialis*, havendo um resultado uniforme para todos os parâmetros biométricos analisados nas plantas cultivadas nas câmaras de germinação. A figura 4 A indica o número médio de raízes em plantas analisadas aos 3 meses em cada tratamento. Observa-se que em 15 °C o número de raízes é cerca de 30% menor que aquele apresentado pelas plantas cultivadas em termoperíodo (15 °C escuro/30 °C claro) e que estas apresentaram a metade do número de raízes das plantas mantidas em 30 °C. A figura mostra, ainda, que o número das raízes das plantas mantidas na Sala de Cultura eram cerca de 15% menores que as da câmara de germinação a 30 °C.

Na figura 4 B são apresentados os dados de 6 meses referentes ao mesmo parâmetro (número de raízes). Observa-se que o padrão se manteve, embora as diferenças tenham diminuído entre os tratamentos de 15 °C (30% menor) e o termoperíodo, e entre as plantas cultivadas a 30 °C e as da Sala de Cultura, que mostraram número praticamente igual.

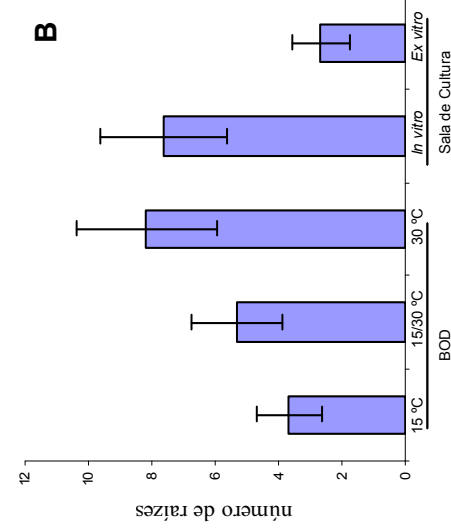
A figura 4 C, referente a 9 meses de cultivo, mostra que o padrão de crescimento das raízes das plantas foi similar ao daquelas com 3 e 6 meses crescidas nas câmaras de germinação, mas o lote mantido na Sala de Cultura teve o número de raízes aumentado, ultrapassando em cerca de 20% o das cultivadas a 30 °C.

Quanto ao comprimento das raízes (figuras 4 D, E, F), observou-se que a 15 °C o valor foi cerca da metade daquele obtido para plantas mantidas sob termoperíodo, enquanto que a 30 °C houve aumento de cerca de 3 vezes em relação ao obtido para plantas em termoperíodo. Notou-se, também, que as plantas mantidas em sala de cultura por 3 meses tinham cerca da metade do comprimento das raízes das plantas mantidas em câmara de germinação a 30 °C, mas, após 6 meses de cultivo, ultrapassaram esse tamanho em cerca de 25% e com 9 meses mantiveram a diferença.

3 meses



6 meses



9 meses

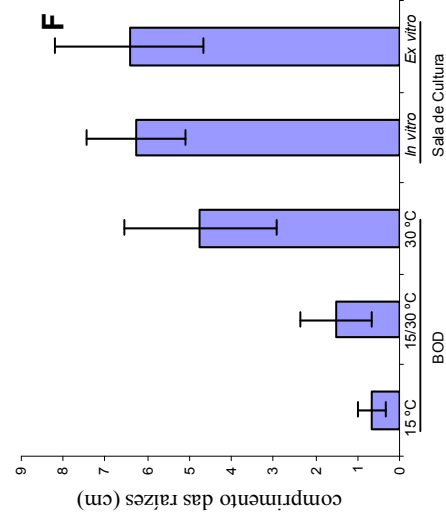
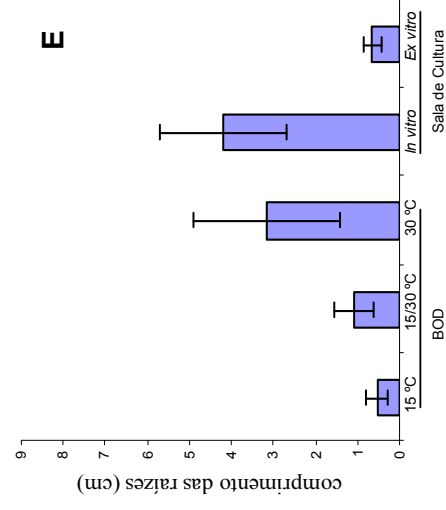
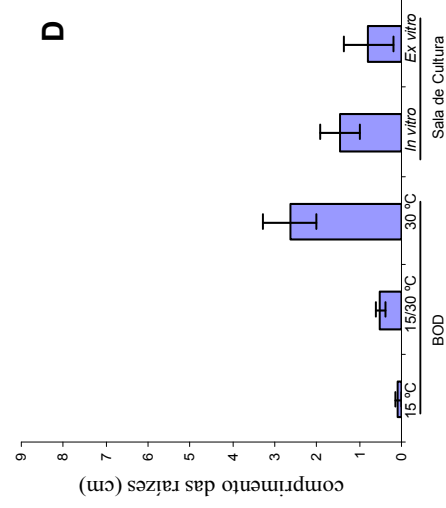
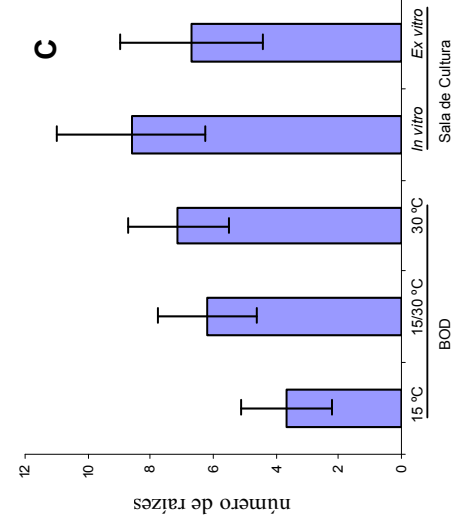


Figura 4. Número e comprimento médio de raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas por 3 meses (A, D), 6 meses (B, E) e 9 meses (C, F) nos diferentes tratamentos térmicos estudados, em câmaras de germinação tipo BOD a 15 °C, 15/30 °C e 30 °C e em Sala de Cultura de Tecidos a 26 °C *in vitro* e *ex vitro*, todos com fotoperíodo de 12 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão.

Em relação ao número de folhas (figuras 5 A, B, C), as plantas cultivadas a 15 °C foram 20 a 30% menores do que as sob termoperíodo e estas também apresentaram redução de 20 a 30% no número de folhas em relação às de 30 °C. Na Sala de Cultura, aos 3 meses, o número de folhas era cerca de 20% menor do que na câmara de germinação a 30 °C, porém aos 6 meses esse número ultrapassou em cerca de 20%, mantendo esta diferença até o final do período de análise (9 meses). Verificou-se que o número de folhas das plantas cultivadas *ex vitro* não foi significativamente diferente das cultivadas *in vitro* relativas à mesma idade nos tratamentos de 30 °C e Sala de Cultura. Esses dados indicam não ter havido modificações morfológicas evidentes como demonstrado para algumas espécies cultivadas *in vitro* (Joyce, *et al.* 2003). A importância de se comparar parâmetros como número de folhas e raízes das plantas cultivadas *in vitro* àquelas *ex vitro* está relacionada à investigação de eventuais anormalidades no aspecto das plantas.

Quanto ao comprimento das folhas (figuras 5 D, E, F) observamos que aos 3 meses de cultivo as plantas de 15 °C eram cerca de 3 vezes menores do que as cultivadas sob termoperíodo e estas apresentavam metade do tamanho das de 30 °C, enquanto que as cultivadas na Sala de Cultura eram 25% menores do que as mantidas a 30 °C.

Aos 6 meses de cultivo, as plantas mantidas a 15 °C tinham folhas 40% menores do que as cultivadas sob termoperíodo e estas eram 20% menores que as mantidas a 30 °C. Também quanto a esse parâmetro, as plantas mantidas em Sala de Cultura por 6 meses tiveram maior comprimento de folhas do que as de 30 °C (cerca de 20% maiores) e esta diferença diminuiu aos 9 meses de cultivo para cerca de 5%, porém ainda mantendo maior comprimento.

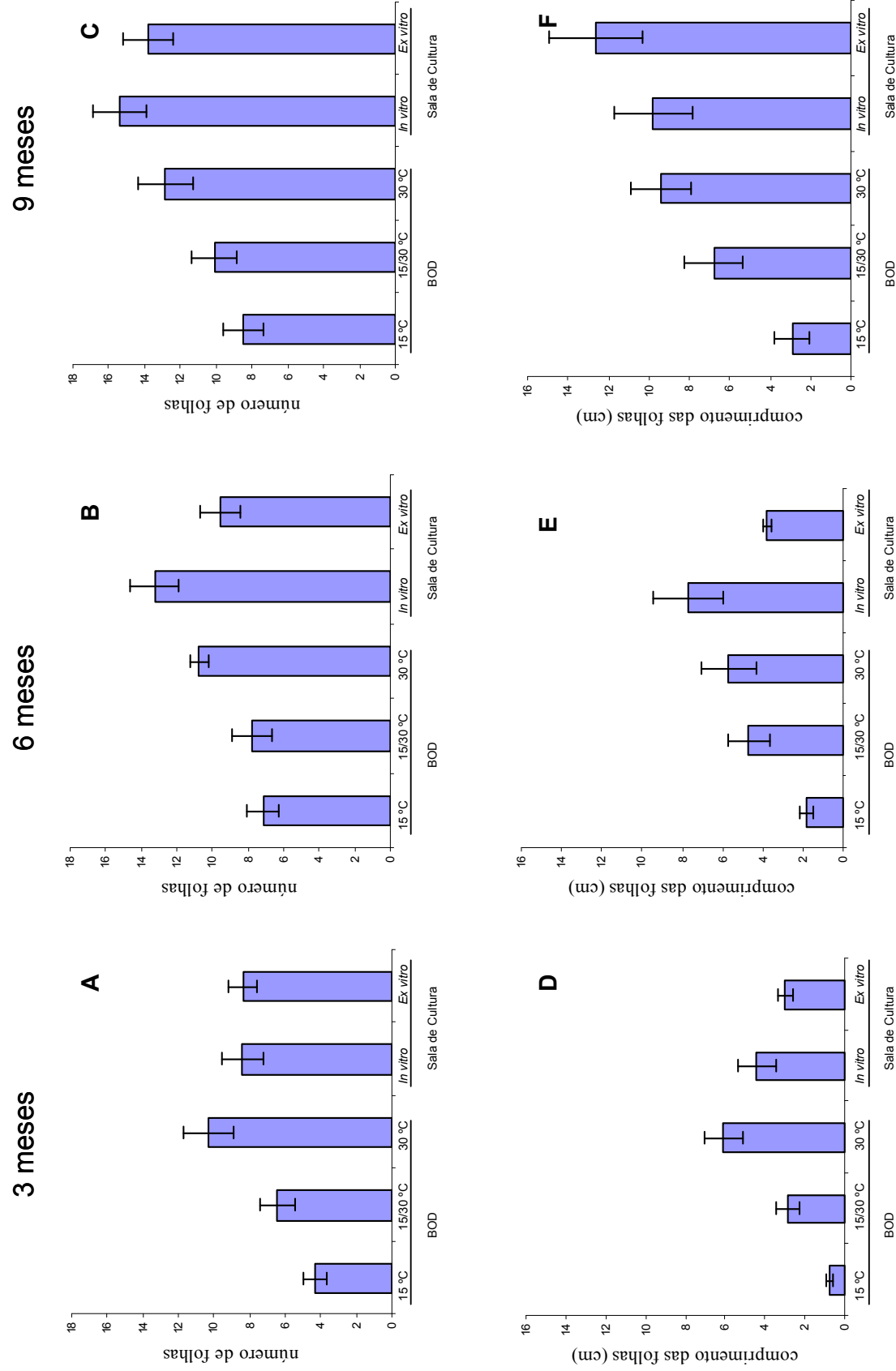


Figura 5. Número e comprimento médio das folhas de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas por 3 meses (A, D), 6 meses (B, E) e 9 meses (C, F) nos diferentes tratamentos térmicos analisados, em câmaras de germinação tipo BOD a 15 °C, 15/30 °C e 30 °C e em Sala de Cultura de Tecidos a 26 °C *in vitro* e *ex vitro*, todos com fotoperíodo de 12 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão.

Clarkson *et al.* (1986) observaram que plantas de regiões temperadas da família Poaceae, como *Lolium perene*, quando cultivadas em temperaturas inferiores a 25 °C tinham menor número de raízes em relação às cultivadas a 25 °C; Perez *et al.* (2001) também reportaram que plantas de *Festuca arundinaceae* cultivadas a 12 °C apresentavam inibição do crescimento foliar em relação às cultivadas a 25 °C.

As análises realizadas no presente trabalho sugerem que a temperatura baixa teve maior influência em inibir o crescimento das plantas de *A. imperialis* do que a temperatura alta em estimular o processo. As figuras 4 e 5 mostraram que houve maior diferença no comprimento e número de raízes ou folhas entre as plantas de 15 °C e as de termoperíodo, do que entre estas (termoperíodo) e as de 30 °C ou da Sala de Cultura (26 °C). Pode-se inferir, também, que até os 6 meses de cultivo, a temperatura teve mais influência no crescimento das plantas do que a irradiância, pois as plantas cultivadas em Sala de Cultura (45 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) até os 6 meses apresentaram crescimento pouco menor do que as cultivadas em câmaras de germinação a 30 °C, onde a irradiância era em torno de 30 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Porém, após 6 meses de cultivo, esta relação foi invertida e a condição de maior irradiância (Sala de Cultura) passou a ter efeito maior na velocidade de crescimento, fazendo com que as plantas mantidas nessas condições por 9 meses tivessem maior comprimento e maior número de folhas e de raízes, do que as mantidas em câmaras de germinação a 30 °C, onde a irradiância era menor.

Assim, tanto para o comprimento quanto para o número de raízes e de folhas, os indivíduos apresentaram maior crescimento com o aumento da temperatura, o que está de acordo com dados obtidos por outros autores, trabalhando com plantas da família Bromeliaceae cultivadas *in vitro*. Nievola *et al.* (2005), por exemplo, verificaram que houve redução do crescimento de plantas de *Ananas comosus* quando cultivadas em termoperíodo (28 °C claro/ 15 °C escuro), em comparação com plantas mantidas a 28 °C constante. Pompelli (2006), estudando *Dyckia encholirioides* var

encholirioides (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) verificou que o frio (4 °C) retardou a velocidade de germinação da espécie, não diminuindo, entretanto seu potencial germinativo. Observou-se ainda que as sementes não possuíam barreira germinativa quando germinadas *in vitro*, ao contrário do que acontece na natureza, onde encontram outras barreiras, provavelmente de natureza física, impossibilitando a germinação (Pompelli 2006).

Segundo Taiz & Zeiger (2004), quando espécies tropicais e subtropicais são submetidas a temperaturas entre 15 °C e 10 °C ocorre crescimento mais lento.

Bartholomew & Malézieux (1994), estudando a bromélia *Ananas comosus* relataram que o acúmulo de matéria seca diminuiu quando as plantas eram cultivadas em temperaturas maiores (de 16,5% de massa seca em 15 °C para 12,5% a 30 °C), apesar de apresentarem maior altura, estabelecendo, portanto, uma correlação negativa entre o comprimento das folhas e o acúmulo de massa seca. Segundo esses autores, a alteração na quantidade de massa seca em função da temperatura contribui para atestar a adaptabilidade morfológica da variedade de abacaxizeiro, a Smooth Cayenne, a uma grande diversidade de regimes termoperiódicos.

Os dados sobre a massa fresca e seca de raízes das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas nos diferentes tratamentos estão mostrados na figura 6, onde se observa que aos 3 meses de cultivo (figura 6 A), as raízes apresentavam tamanho muito reduzido a 15 °C, não sendo possível determinar com precisão os valores das massas. A massa fresca das raízes das plantas cultivadas em termoperíodo foi cerca de 8 vezes menor do que a das plantas cultivadas em 30 °C. Aos 6 meses de cultivo (figura 6 B), o padrão de crescimento se repetiu para as plantas cultivadas em câmaras de germinação, as de 15 °C com cerca da metade do tamanho das de termoperíodo e por sua vez estas com cerca de 25% da massa das cultivadas a 30 °C. As plantas cultivadas na Sala de Cultura, com 6 meses atingiram a mesma massa fresca das mantidas em 30 °C. Este padrão se manteve inalterado aos 9 meses de cultivo (figura 6 C).

Analisando os dados de massa fresca e seca da parte aérea das plantas cultivadas nos diferentes tratamentos (figura 7) observa-se o mesmo padrão encontrado para as raízes aos 3, 6 e 9 meses, indicando que o efeito da temperatura estava relacionado com o incremento de massa nas plantas. Naquelas plantas mantidas na Sala de Cultura, com maior iluminação, houve maior incremento de massa a partir de 6 meses de cultivo, ultrapassando as plantas mantidas a 30 °C e, portanto, confirmando observações anteriores quanto aos demais parâmetros analisados. Observou-se esse padrão também para as plantas cultivadas *ex vitro*.

Analisando separadamente a distribuição de biomassa nas plantas cultivadas nas câmaras de crescimento sob diferentes tratamentos térmicos (tabela 1) observa-se que aos 3 meses de cultivo, as plantas mantidas a 15 °C apresentaram praticamente toda a biomassa alocada para o eixo caulinar, formado pelo caule e folhas. Nas plantas mantidas em termoperíodo de 15/30 °C o sistema radicular começou a se desenvolver aos 3 meses, mas ainda constituía apenas 5% da biomassa total, enquanto que nas plantas mantidas a 30 °C a biomassa era alocada em sua maior porcentagem (17%) para a região radicular.

Aos 6 e aos 9 meses de cultivo observou-se um padrão semelhante na distribuição da biomassa, havendo maior alocação para a região do eixo caulinar em relação à biomassa radicular, sendo essa diferença mais expressiva nas plantas cultivadas em condições onde as temperaturas eram mais baixas (15 °C e 15 °C/30 °C). As mantidas em 30 °C apresentaram entre 23 e 27% da biomassa alocada para as raízes.

Os dados obtidos permitem concluir que as plantas de *Alcantarea imperialis* quando cultivadas sob temperaturas mais baixas concentram maior biomassa na parte aérea (caule e folhas).

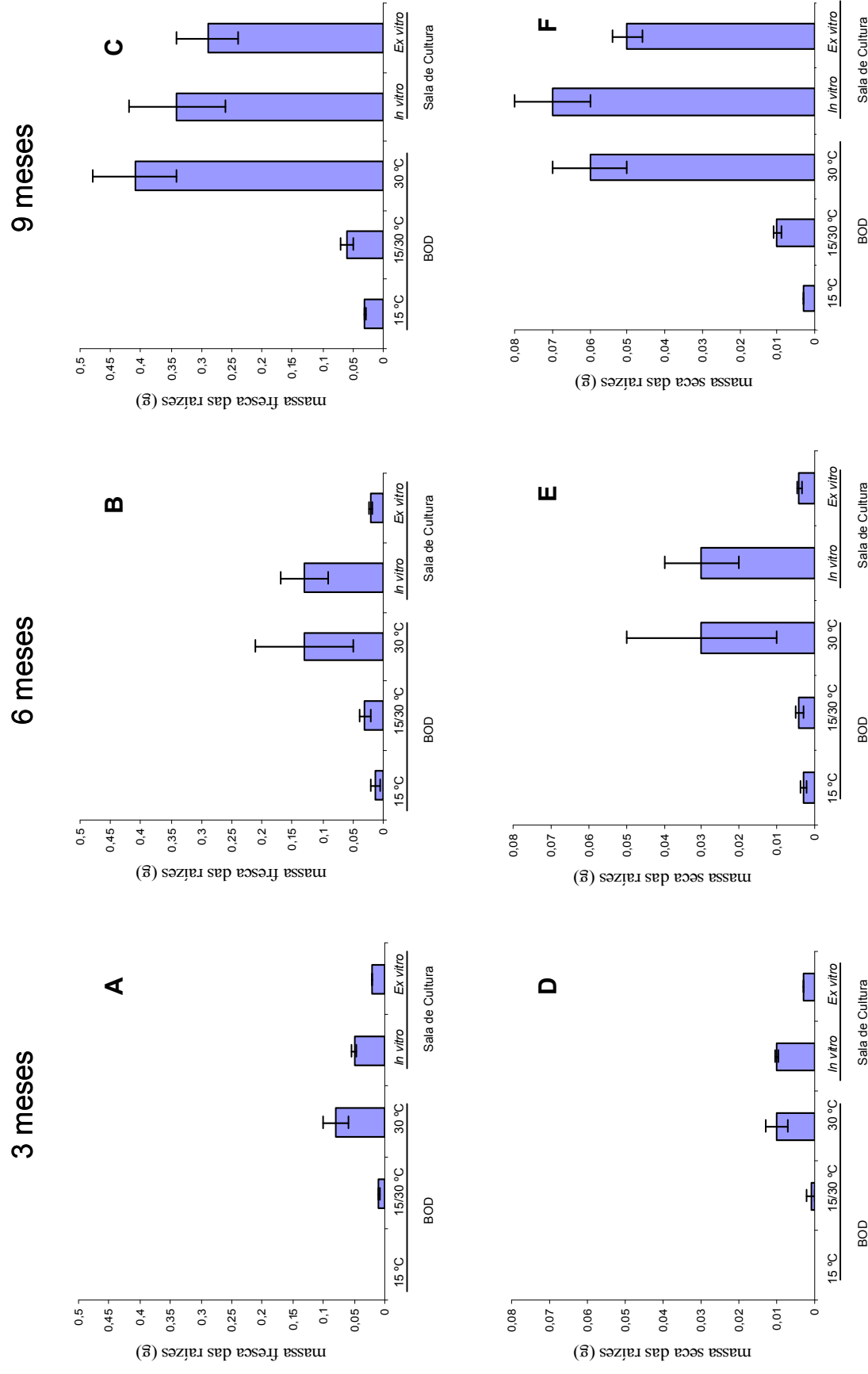
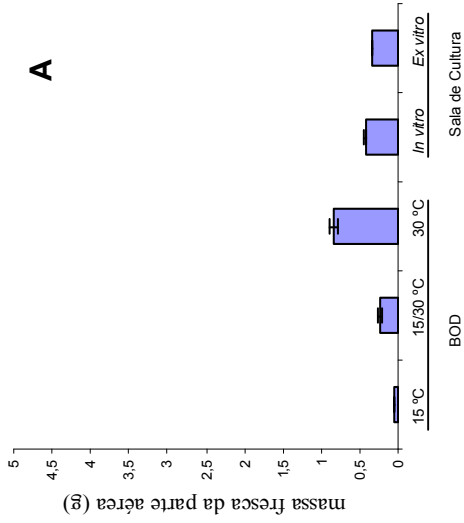
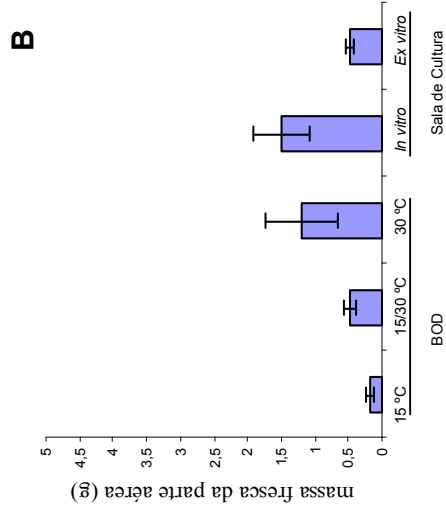


Figura 6. Massas fresca e seca das raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas por 3 meses (A, D), 6 meses (B, E) e 9 meses (C, F) nos diferentes tratamentos térmicos analisados, em câmaras de germinação tipo BOD a 15 °C, 15/30 °C e 30 °C e em Sala de Cultura de Tecidos a 26 °C *in vitro* e *ex vitro*, todos com fotoperíodo de 12 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão.

3 meses



6 meses



9 meses

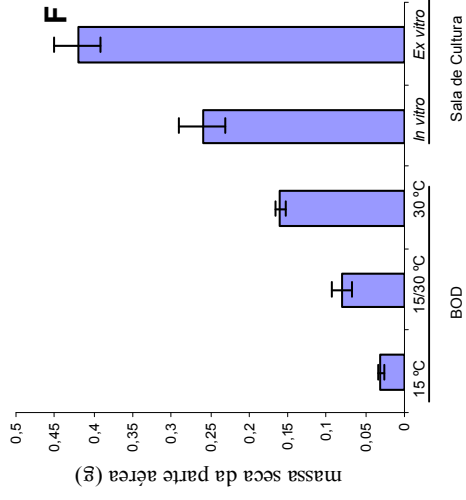
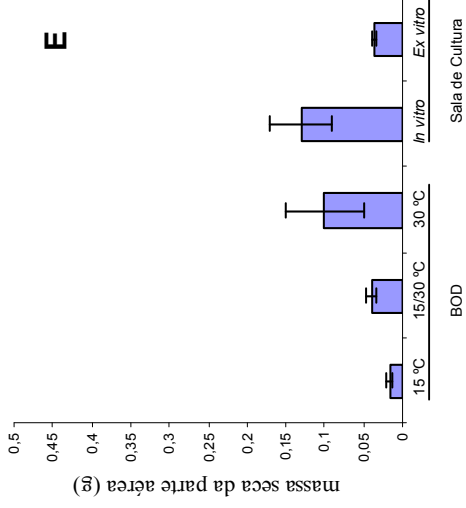
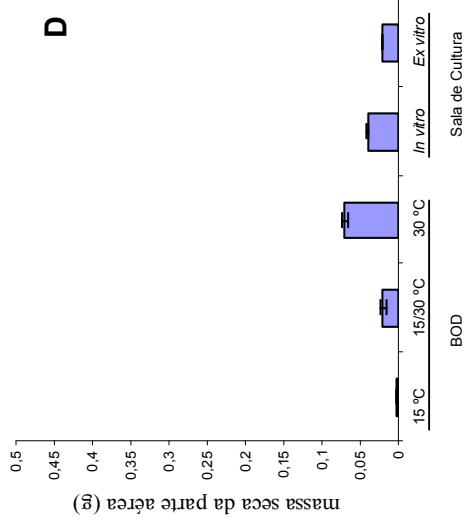
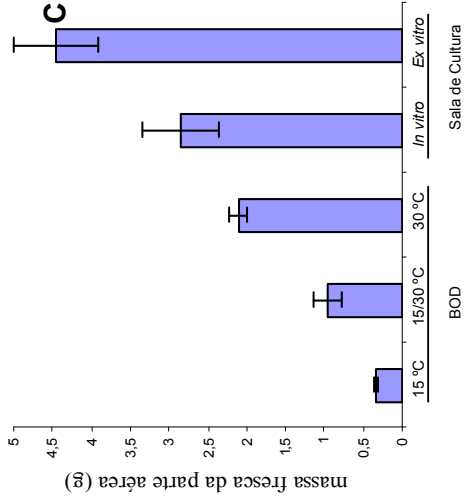


Figura 7. Massas fresca e seca da parte aérea de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas por 3 meses (A, D), 6 meses (B, E) e 9 meses (C, F) nos diferentes tratamentos térmicos estudados, em câmaras de germinação tipo BOD a 15 °C, 15/30 °C e 30 °C e em Sala de Cultura de Tecidos a 26 °C *in vitro* e *ex vitro*, todos com fotoperíodo de 12 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão.

Tabela 1. Distribuição de biomassa (calculada com base na massa seca) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* em câmaras de germinação sob diferentes tratamentos térmicos.

	3 meses			6 meses			9 meses		
	15 °C	15/30 °C	30 °C	15 °C	15/30 °C	30 °C	15 °C	15/30 °C	30 °C
Raiz	0%	5%	17%	11%	9%	23%	9%	11%	27%
Caule	50%	47,5%	33%	33%	45,5%	31%	30%	33%	23%
Folha	50%	47,5%	50%	56%	45,5%	46%	61%	56%	50%

A tabela 2 apresenta os dados de crescimento da parte aérea e da parte radicular, expressos pela razão das massas fresca e seca das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas por 3, 6 e 9 meses nos diferentes tratamentos. Observa-se que nas plantas submetidas a temperatura baixa houve de fato maior alocação de biomassa para a parte aérea e em temperaturas mais altas, o resultado se inverteu, passando a existir maior biomassa no sistema radicular.

Tabela 2. Crescimento das partes aérea e radicular, expresso pela razão das massas fresca e seca de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 3, 6 e 9 meses sob diferentes temperaturas, em câmaras BOD, em comparação com plantas crescidas na Sala de Cultura, a 26 °C.

Tratamentos		3 meses		6 meses		9 meses	
		Massa Fresca Aérea/Raiz	Massa Seca Aérea/Raiz	Massa Fresca Aérea/Raiz	Massa Seca Aérea/Raiz	Massa Fresca Aérea/Raiz	Massa Seca Aérea/Raiz
	15 °C	---	---	14,6	8,0	11,3	10,0
	15 °C/ 30 °C	18,0	20,0	16,0	10,0	15,8	8,0
	30 °C	10,5	5,0	9,2	3,3	5,1	2,7
<i>in vitro</i>	Sala de Cultura	8,6	4,0	11,6	4,3	8,4	3,7
<i>ex vitro</i>	Sala de Cultura	17,0	6,7	22,4	9,2	10,8	7,5

Esses resultados obtidos diferem daqueles relativos a plantas que acumulam carboidratos no sistema subterrâneo, nas quais temperaturas baixas em geral tendem a favorecer a alocação de biomassa para estas estruturas, muitas vezes produzindo órgãos de reserva, como tubérculos, rizóforos e raízes tuberosas (Salisbury & Ross 1991, Larcher 2006, Figueiredo-Ribeiro *et al.* 2008). O fato de *Alcantarea imperialis* ser uma espécie de hábito rupícola poderia estar

relacionado aos resultados obtidos, pois na natureza seu sistema radicular teria como principal função o suporte da planta, enquanto o eixo caulinar desempenharia as funções de acúmulo de reservas. Outras estratégias metabólicas atribuídas ao eixo caulinar em bromélias já foram demonstradas (Nievola & Mercier 1996, De Paula 1998, Endres & Mercier 2000, Nievola *et al.* 2001, Endres & Mercier 2003, Takahashi *et al.* 2007).

Literatura citada

- Andreas, K.** 2006. Growing *Alcantarea* Species: Illustrating Terrie Bert's Article. Newsletter of the Bromeliad Society of Central Florida 32 (02). <http://fcbs.org/newsletters/BSCF/022006.pdf> consultado em 16/12/2008.
- Bartholomew, D. P. & Malézieux, E. P.** 1994. Pineapple. In: Schaffer. B.: Andersen, P.C. eds. Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops, Vol.2. Boca Raton: CRC Press: 243-291.
- Browse, J. & Xin, Z.** 2001. Temperature sensing and cold acclimation. Current Opinion in Plant Biology 4: 241-246.
- Clarkson, D. T., Hopper, M. J. & Jones, L. H. P.** 1986. The effect of root temperature on the uptake of nitrogen and the relative size of the root system in *Lolium perenne*. I. Solutions containing both NH_4^+ and NO_3^- . Plant, Cell and Environment 9:535-545.
- De Paula, C.C.** 1998. Cultivo de bromélias para fins comerciais ou hobby. CTP, Viçosa. 74p.
- Endres, L. & Mercier, H.** 2000. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. Journal of Plant Physiology. 15(2):205-212.
- Endres, L. & Mercier, H.** 2003. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated *in vitro*. Plant Physiology and Biochemistry 41 (2003) 181-187
- Figueiredo-Ribeiro, R. C. L, Chu, E. P. & Almeida, V. P.** 2008. Tuberização. Pp. 409-419 In Fisiologia Vegetal - 2a. Edição (G. B. Kerbauy, Ed.). Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro (RJ), 431p.
- Islam, M. T., Dembele, D. P. & Keller, E. R. J.** 2005. Influence of 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.

- Jimenez, R. M. & Caballero, M. R.** 1990. El cultivo industrial de plantas en maceta. Reus: Ediciones de Horticultura, 664p.
- Joyce, S. M., Cassells, A. C. & Jain, M.** 2003. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 103-121.
- Larcher, W.** 2006. Ecofisiologia Vegetal. RiMa, São Carlos, SP, 398 p.
- Leme, E. M. C & Marigo, L. C.** 1993. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda. Rio de Janeiro. 183p.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-479.
- Nievola, C. C. & Mercier, H.** 1996. The Importance of leaf and root systems in nitrate assimilation in *Vriesea fosteriana*. Bromelia 3:14-18.
- Nievola, C. C., Mercier, H. & Majerovicz, N.** 2001. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. Journal of Plant Nutrition, 24(9):1387-1398.
- 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 grown *in vitro*. In Vitro Plant Cellular & Developmental Biology 41: 832-837.
- Okusanya, O. T.** 1980. Germination and growth of *Celosia cristata* L. under various light and temperature regimes. American Journal of Botany 67: 854-858.
- Perez, P., Morcuende, R., Molino, I. M., Puente, L. S. & Martinez-Carrasco, R.** 2001. Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clover. Physiologia Plantarum 112: 478-486.
- Pierik, R. L. M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 343 p.

- Pompelli, M. F.** 2006. Germinação de *Dyckia encholirioides* var *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). *Flora e Ambiente* 13(1): 01-09.
- Popinigis, F.** 1985. Fisiologia da semente. Brasília: AGIPLAN, 289p.
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W.** 1991. *Plant Physiology*. 4th ed. California; Wadsworth Publishing Company, 682p.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. *Plant Physiology* – 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, MA, USA. 792 p.
- Takahashi, C. A., Ceccantini, G. C. T. & Mercier, H.** 2007. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19:119-126.

Efeito da temperatura no conteúdo e na composição de carboidratos não-estruturais em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*

RESUMO – (Efeito da temperatura no conteúdo e na composição de carboidratos não- estruturais em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*). Mudanças de temperatura do ambiente influenciam drasticamente o desenvolvimento vegetal. Sob temperaturas baixas, geralmente ocorre redução de crescimento e metabolismo, levando a alterações no conteúdo e na composição de carboidratos que poderiam estar relacionados a tolerância ao frio. O estudo da influência da temperatura em plantas pode ser otimizado por meio do cultivo *in vitro*, permitindo um controle desta variável, de modo a viabilizar a formação de coleções vivas sob crescimento lento. O objetivo deste trabalho foi avaliar as variações quantitativas e qualitativas dos carboidratos não estruturais em plantas de *A. imperialis* (bromélia imperial), a partir de sementes germinadas *in vitro* em câmaras de germinação sob fotoperíodo de 12 h, a 15 °C, 15/30 °C (termoperíodo escuro/claro) e 30 °C. Para comparação, um lote controle foi cultivado *in vitro* em sala de cultura a 26 °C e outro *ex vitro*, utilizando casca de pinus como substrato. As análises de carboidratos indicaram haver maior quantidade de açúcares solúveis totais nas plantas cultivadas a 15 °C em relação às cultivadas a 30 °C. Contudo, os maiores valores foram encontrados nas plantas cultivadas sob termoperíodo. O aumento no conteúdo de carboidratos solúveis e a redução no teor de amido, especialmente na parte aérea das plantas cultivadas *in vitro* sob temperaturas baixas indicam que esses compostos poderiam estar envolvidos na plasticidade térmica de *A. imperialis* e na crioproteção das plantas em condições de abaixamento de temperatura.

Palavras-chave: amido, Bromeliaceae, carboidratos solúveis, cultivo *in vitro*, temperaturas baixas

ABSTRACT – (Effect of temperature on non-structural carbohydrates of plants of *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultured *in vitro*). Changes in the environmental conditions, especially temperature drastically influence plant development. Generally under low temperatures occurs a reduction of growth and in the plant metabolism, leading to an increase on carbohydrate production, promoting resistance to the cold. The study of temperature influencing plants can be optimized through *in vitro* growth, allowing control of this variable and generating plant collections under slow growth. The aim of this work was to evaluate quantitative and qualitatively the variations of non-structural carbohydrates in *A. imperialis* (bromélia imperial) plants, cultured *in vitro* from seeds in growth chambers under photoperiod of 12 h, at 15 °C, 15/30 °C (thermoperiod dark/light) and 30 °C. For comparison, a control lot was grown *in vitro* in a culture room under 26 °C and another in a greenhouse, using pinus cork as substrate. The carbohydrate analysis indicated the existence of higher amounts of total sugars in plants grown under 15 °C in relation to the ones grown under 30 °C. The highest values of sugars were found in plants grown under thermoperiodic conditions. The increase of soluble carbohydrates and the reduction of starch levels, especially in the aerial parts of plants grown *in vitro* under low temperatures could indicate that these compounds are involved in the thermal plasticity of *A. imperialis* and on the cryoprotection of plants under low temperatures.

Keywords: Bromeliaceae, *in vitro* culture, low temperatures, soluble carbohydrates, starch.

Introdução

A temperatura é um fator muito importante para a vida de todos os seres vivos, especialmente para os vegetais, seres sésseis, o que faz com que as adaptações das plantas frente às alterações desse fator abiótico devam ser rápidas e eficientes, para garantir sua sobrevivência (Browse & Xin 2001).

Com a redução da temperatura, também podem ocorrer diminuição na velocidade das reações químicas e, portanto do metabolismo, decréscimo na biossíntese de compostos e alterações no crescimento (Larcher 2006). Mudanças em poucos graus ocorridas no ambiente natural geralmente levam a alterações significativas nas taxas de crescimento (Salisbury & Ross 1991).

O cultivo *in vitro* tem sido uma das ferramentas utilizadas para o estudo da influência da temperatura em plantas, pois permite um controle rígido das variáveis que se pretende avaliar, propiciando a formação de coleções vivas com crescimento lento (Islam *et al.* 2005), o que também é vantajoso.

Em 85 % das Angiospermas, a fixação do carbono em compostos orgânicos ocorre pela via C_3 , sendo esse ciclo plenamente ativo em presença de luz e inativo no escuro (Majerowicz 2008). O metabolismo CAM (do inglês: crassulacean acid metabolism) é um mecanismo fotossintético concentrador de CO_2 e foi selecionado possivelmente em resposta à aridez de ambientes terrestres (Keely 1998). Nestas plantas, o CO_2 fixado é acumulado nos vacúolos sob a forma de malato, contribuindo para a acidez celular. Durante o dia, os estômatos se fecham, e o CO_2 , utilizado no ciclo C_3 , passa a ser fornecido pela descarboxilação do malato (Majerowicz 2008). Durante a noite o amido que foi produzido e acumulado passa a ser hidrolizado para a produção de PEP, acumulando-se de dia como produto da fotossíntese e da descarboxilação do malato (Majerowicz 2008). Aproximadamente dois terços das bromélias são plantas CAM e ocupam locais áridos ou são epífitas. Muitas espécies vivem à sombra total ou parcial e outras são totalmente expostas ao

sol (Martin 1994). Segundo esse autor, a fotossíntese é ótima quando as temperaturas diurnas são amenas e as noturnas, levemente mais baixas. Temperaturas constantes reduzem a absorção de CO₂ no período noturno.

Na bromélia *Ananas comusus* L., a máxima atividade fotossintética em plantas cultivadas em casa de vegetação aparentemente ocorre sob regime de temperaturas alternadas de 30 °C (dia) e 15 °C (noite) (Martin 1994). Recentemente, Nievola *et al.* (2005) reportaram que plantas dessa espécie clonadas e cultivadas *in vitro* apresentavam diminuição no crescimento quando mantidas sob termoperíodos (28 °C claro/15 °C escuro) em relação àquelas mantidas a 28 °C constante, ambas sob fotoperíodo de 12 horas.

Alcantarea imperialis (Carrière) Harms (bromélia imperial) apresenta hábito saxícola ou rupícola, crescendo naturalmente sobre afloramentos rochosos ou solos rasos e pedregosos, sendo exposta a alta luminosidade. É nativa da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, área de Floresta Tropical e Campos de Altitude, sendo que acima de 800 metros esta região possui clima mesotérmico brando com temperaturas médias de 19 °C, que podem oscilar entre 40 °C e 5 °C em um único dia. A espécie, portanto, tem grande plasticidade a variações de temperatura, sendo considerada tolerante ao frio (Andreas 2006).

A tolerância ao frio é regulada tanto pela qualidade como pela quantidade de açúcares presentes nos vários estágios de desenvolvimento das plantas (Figueiredo-Ribeiro 1980). Assim, além da redução do crescimento, outras características têm sido correlacionadas à tolerância ao frio, dentre elas o aumento de açúcares solúveis (Ali *et al.* 1996, Gupta & Kaur 2005). Para tolerar o frio, algumas plantas acumulam carboidratos e/ou proteínas específicas que estabilizam as membranas celulares durante a desidratação induzida por temperaturas baixas. Por exemplo, plantas de trigo acumulam sacarose nessas condições e as altas concentrações desse açúcar nas células impedem a formação de cristais de gelo evitando, portanto, danos celulares irreversíveis (Taiz & Zeiger 2004). Temperaturas baixas também estimulam a redução do teor de amido e o

concomitante aumento de açúcares solúveis em várias espécies e este aumento tem sido associado à tolerância ao frio nessas plantas (Kaplan *et al.* 2006).

Mudanças nas concentrações de açúcares solúveis foram interpretadas como uma resposta rápida de *Arabidopsis thaliana* L. à temperatura baixa, ocorrendo após duas horas de exposição a 1 °C (Wanner & Junttila 1999). Como essas mudanças precedem alterações mensuráveis de tolerância ao congelamento, ainda não está claro se os açúcares estão relacionados à aclimação ao frio ou se agem indiretamente como fonte de energia para subseqüentes mudanças metabólicas que levam à tolerância ao congelamento (Klotke *et al.* 2004).

Como os carboidratos podem ser acumulados em resposta a estresses ambientais, como o frio e a seca, atuando como crio-ou osmoprotetores celulares (Leslie *et al.* 1995), torna-se importante avaliar se ocorrem alterações quantitativas e qualitativas nos carboidratos de plantas de *Alcantarea imperialis* quando cultivadas *in vitro* sob temperaturas baixas. Essas alterações poderiam estar associadas à proteção das plantas sob baixa temperatura, já que em condições naturais plantas dessa espécie estão sujeitas a variações de temperatura e seca muito intensas em curto intervalo de tempo. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo analisar o conteúdo e a composição dos carboidratos não-estruturais em plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* sob diferentes regimes de temperatura, com vistas a avaliar a participação desses compostos na proteção das plantas sob condições ambientais estressantes.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal

Sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms foram obtidas de indivíduos da coleção de Bromélias da Seção de Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo no

segundo semestre de 2006. Os apêndices plumosos foram removidos e as sementes foram desinfestadas por imersão em etanol 70 % durante 5 min, seguida de imersão em solução do fungicida benomyl a 0,1% por 20 min e por 60 min em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5 % contendo 5 gotas de Twin® 20, sob agitação contínua.

Condições de cultivo

Após a desinfestação, as sementes foram enxaguadas em câmara de fluxo laminar com água destilada e inoculadas em placas de Petri (70 sementes por placa) contendo 10 mL de meio de cultura Murashige & Skoog (1962), esterilizado em autoclave, contendo a concentração de micronutrientes original e de macronutrientes reduzida à metade, adicionado de 100 mg L⁻¹ de *myo*-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de agar (Difco). O pH foi ajustado para 5,8.

Cerca de 2000 sementes foram utilizadas para cada tratamento e mantidas em câmaras de germinação do tipo BOD (FANEM). Foram mantidas em três regimes de temperatura controlada: 15 °C constante, 15 °C escuro/30 °C claro e 30 °C constante, todas sob fotoperíodo de 12 horas. Um lote também foi mantido em Sala de Cultura da Seção de Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica a 26 °C ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas (45 µmoles m⁻² s⁻¹) e outro de 500 sementes em câmara de germinação a 5 °C.

Após a emergência das plântulas, o material foi transferido para frascos de vidro contendo 40 mL do meio (15 plântulas por frasco) e mantidas por 9 meses nessas condições, com troca do meio de cultura cerca de 5 meses após a transferência para evitar deficiência nutricional. Paralelamente, foi preparado outro lote de 2000 sementes, desinfestadas como descrito acima e depositadas em caixas do tipo Gerbox, com papel umedecido em água destilada, sendo mantidas em Sala de Cultura a 26 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Após esse período, as plântulas foram transferidas para bandejas de isopor contendo casca de pinus fina como substrato (Jimenez &

Caballero 1990). Este lote foi envolvido por saco plástico transparente e regado uma vez por semana com solução nutritiva constituída pela concentração original de micronutrientes do meio de Murashige & Skoog (1962) e a concentração de macronutrientes reduzida à metade e com água destilada duas vezes por semana, durante todo o período de análises (9 meses).

O desenho experimental constou de cinco tratamentos, sendo três em câmaras de germinação (*in vitro*), e dois em Sala de Cultura sendo um *in vitro* e outro *ex vitro*, dos quais foram retiradas amostras de cerca de 120 plantas aos 6 e 9 meses para a análise de carboidratos. Folhas, caule e raízes foram avaliados separadamente (figura 1), sendo todas as análises realizadas em triplicata. Após as coletas (6 e 9 meses) o material foi pesado e armazenado em freezer a – 20 °C para posterior extração e análise dos carboidratos.

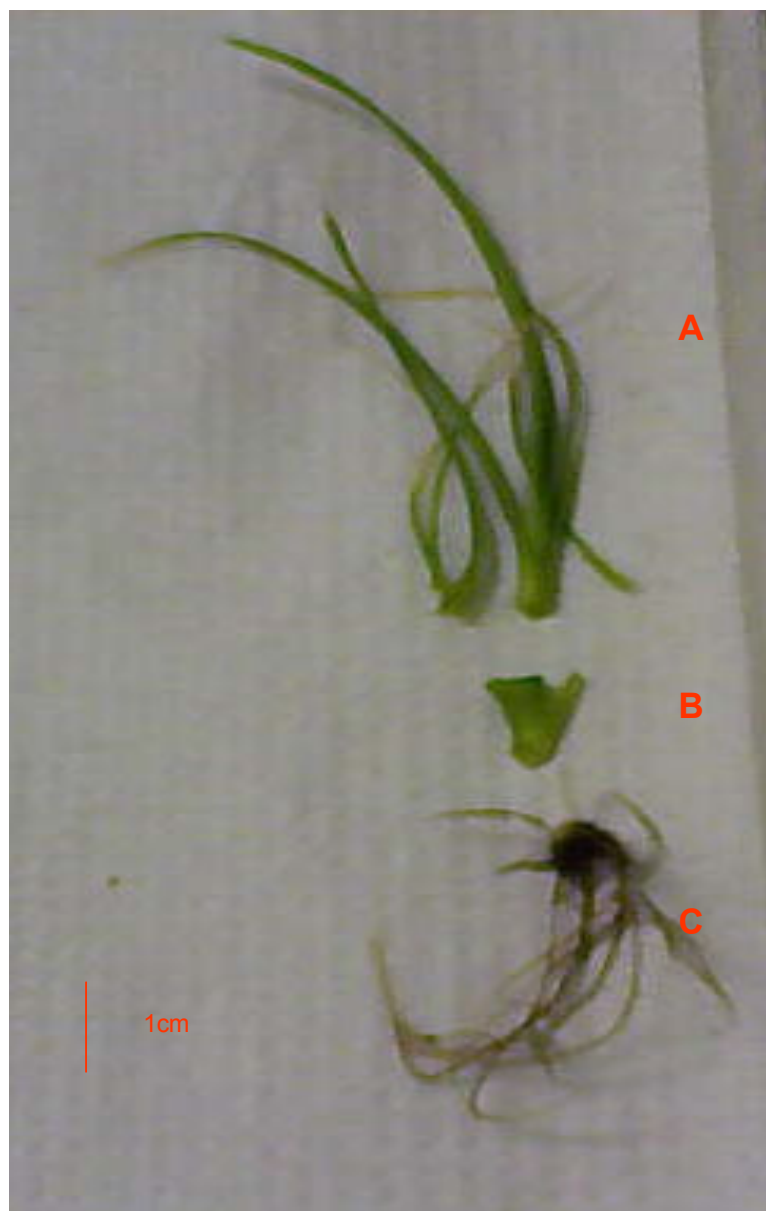


Figura 1. Regiões das plantas de *Alcantarea imperialis* analisadas separadamente após as coletas: (A) Folhas (lâminas, excluindo as bainhas foliares); (B) caule (região contendo caule e parte das bainhas foliares) e (C) sistema radicular.

Extração e análise de carboidratos solúveis

Por ocasião das análises, o material foi descongelado e homogeneizado em almofariz e levado ao banho-maria a 80 °C com etanol 80% por 15 min e depois centrifugado a 700 g por 15 min a temperatura ambiente. Foi separado o sobrenadante do resíduo e o procedimento foi repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, constituindo o extrato etanólico (EtOH).

Ao resíduo foi adicionada água destilada e levado ao banho-maria a 60 °C por 30 min. O material foi filtrado à vácuo em tecido de algodão. O procedimento também foi repetido duas vezes e os sobrenadantes reunidos, constituindo o extrato aquoso. O resíduo foi armazenado a -20 °C para posterior extração de amido.

Os extratos etanólicos foram concentrados em rotaevaporador a 37 °C até pequeno volume e retomados em 5 mL de água destilada para as análises colorimétricas. A fração aquosa foi concentrada em liofilizador até o mesmo volume.

Um fluxograma da extração de carboidratos solúveis está representado na figura 2.

O teor de açúcar total foi determinado colorimetricamente pelo método de fenol-sulfúrico conforme descrito por Dubois *et al.* (1956), sendo utilizada a solução de glucose ($100\mu\text{g mL}^{-1}$) para a elaboração da curva padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm. A quantificação de açúcares totais foi realizada utilizando-se a equação da reta obtida a partir da curva padrão construída.

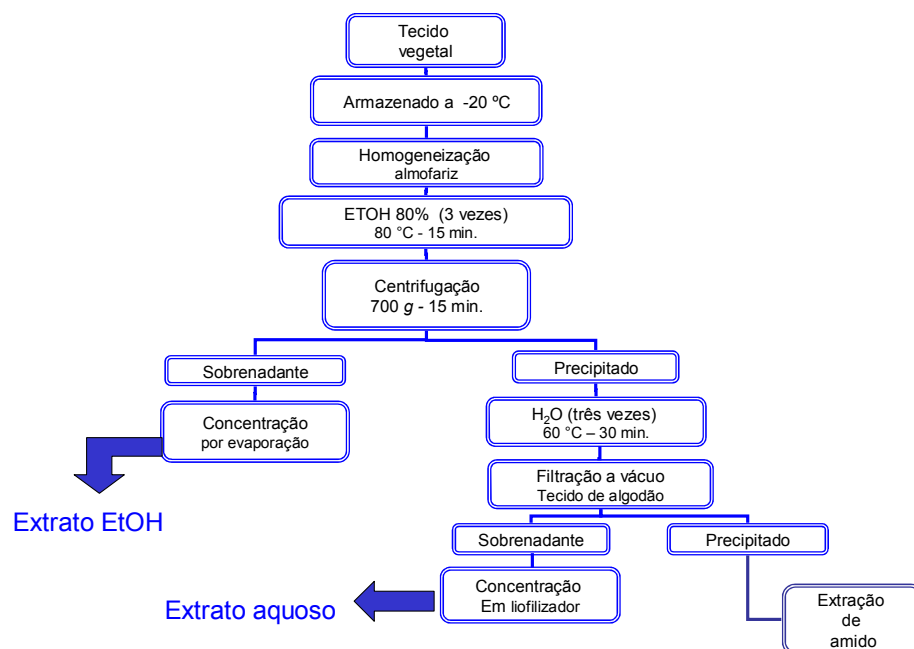


Figura 2. Fluxograma da extração de carboidratos solúveis de plantas de *A. imperialis*.

Após a quantificação dos açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico, separaram-se amostras em volume calculado para se obter 5 mg de açúcar em cada extrato. A seguir estas amostras foram purificadas em colunas de troca iônica (10 x 1) utilizando-se resinas Dowex na forma catiônica (50 x 40 - 200) e aniônica (1 x 8 - 200) (Carvalho & Dietrich 1993). Após a aplicação da amostra no topo da coluna, a mesma foi eluída com 20 volumes de água destilada. A seguir os eluatos foram concentrados em rotaevaporador até a secura e retomados com 1,5 mL de água deionizada, sendo novamente quantificados. Amostras contendo um volume equivalente a 400 µg de açúcar (para cada amostra) foram filtradas em membranas de 0,45 µm e analisadas através de cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema DIONEX, modelo ICS3000, em coluna CarboPac PA-1 (2 x 250mm). Foram utilizados dois gradientes de misturas entre o eluente A (água) e o eluente

B (hidróxido de sódio 250 mM). O primeiro foi utilizado para análise de oligossacarídeos e a programação utilizada foi: 0 – 15 min, 100 mM; 15,1 – 20 min, 200 mM; 20,1 – 25,5 min., 100 mM. No segundo, para a análise dos açúcares de menor peso molecular, a programação utilizada foi: 0 – 9,9 min, 15 mM; 10,0 – 15,9 min, 20 mM; 16,0 – 16,09 min, 50 mM; 16,1 – 20,5 min, 200 mM; 20,6 – 31 min, 15 mM. Em ambos os gradientes, o fluxo aplicado foi de 0,25 mL min⁻¹.

O fluxograma de purificação dos extratos para as análises qualitativas dos carboidratos solúveis por HPAEC/PAD está representado na figura 3.

Também, como uma segunda ferramenta para identificação dos carboidratos solúveis, foi utilizada a cromatografia em camada delgada (TLC). Nesta análise foram avaliadas amostras de extratos etanólicos e aquosos de *Alcantarea imperialis* após purificação em colunas de trocas aniônica e catiônica, sendo concentradas até secura, retomadas em 2 µL de água e aplicadas nas cromatoplasmas de sílica gel 60 F 254 Merck, modificado a partir de Kanaya *et al.* (1978), sendo utilizado como solvente álcool isobutílico, 1-propanol e água (3:12:4, v/v). Os carboidratos foram visualizados após aspersão com uma solução de ácido sulfúrico em etanol a 5 %, seguida de aquecimento por 5 min a 150 °C; os componentes foram identificados por comparação com padrões autênticos de carboidratos adquiridos da Sigma (USA).

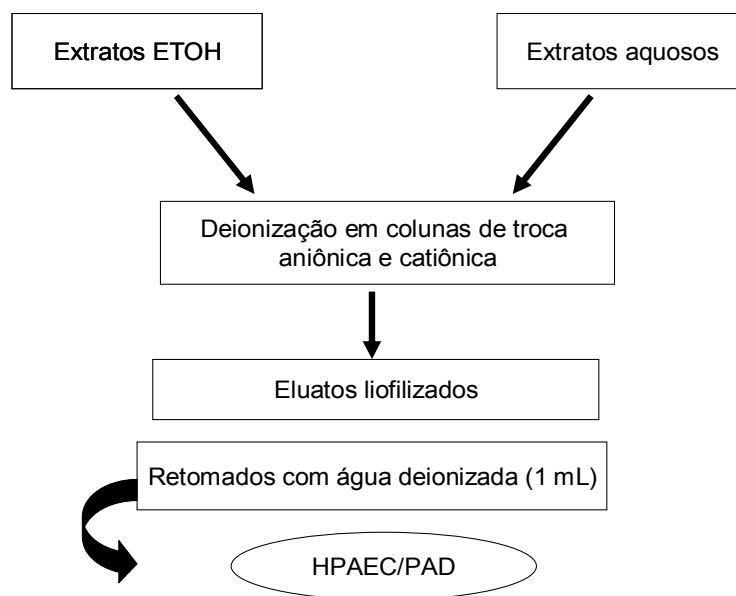


Figura 3. Fluxograma de purificação dos extratos para análises qualitativas de carboidratos solúveis de plantas de *A. imperialis*.

Quantificação de amido

Os resíduos da extração de carboidratos solúveis congelados foram liofilizados e homogeneizados em almofariz, sendo pesados 10 mg de cada amostra para a quantificação do amido, por meio de método enzimático, realizando-se digestões com amilase e amiloglucosidase (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 glicose na concentração de 1 mg.mL⁻¹. O fluxograma da análise enzimática para a quantificação de amido nas amostras está representado na figura 4.

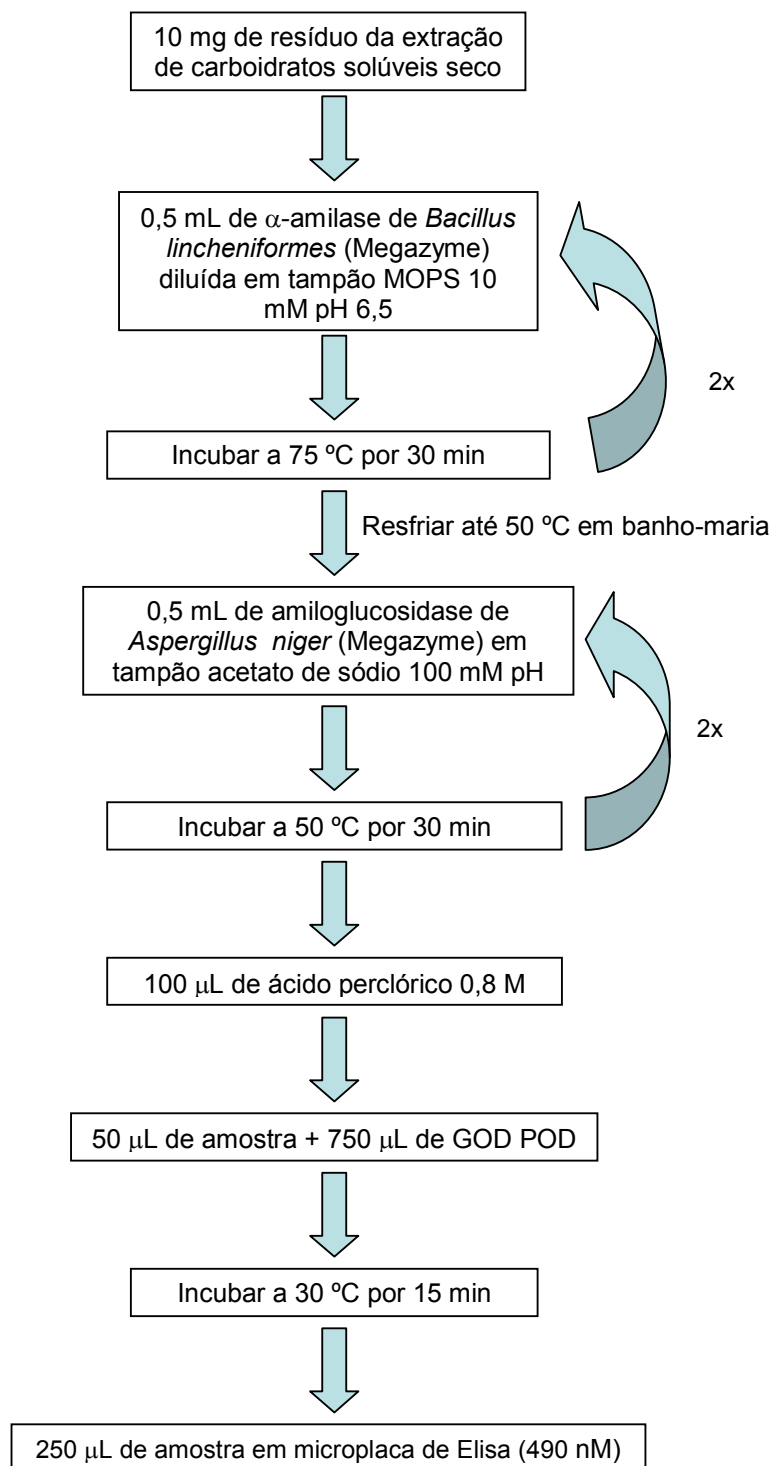


Figura 4. Fluxograma da quantificação de amido em tecidos de *Alcantarea imperialis* (Amaral *et al.* 2007)

Resultados

Os extratos etanólicos e aquosos brutos de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* por 6 meses em câmaras de crescimento foram quantificados separadamente quanto aos carboidratos totais (figura 5). Observa-se que nas plantas cultivadas a 15 °C a quantidade de açúcares solúveis em etanol foi maior que dos solúveis em água e foi semelhante nos diferentes órgãos analisados (raiz, caule e folhas), variando entre 250 e 400 mg g⁻¹MS. Nos extratos aquosos, a quantidade de açúcares solúveis foi similar na parte aérea (folhas e caule) - (cerca de 100 mg g⁻¹MS), enquanto na raiz o valor foi o dobro em relação à parte aérea (figura 5 A).

As quantidades de açúcares solúveis nas folhas, caule e raízes de plantas cultivadas em termoperíodo de 30 °C (claro) e 15 °C (escuro) estão mostradas na figura 5 B. Observa-se neste tratamento um padrão de variação semelhante ao das plantas cultivadas a 15 °C, com tendência ao aumento na concentração total dos açúcares, especialmente nas raízes.

A figura 5 C representa a quantidade de açúcares solúveis nas plantas cultivadas por 6 meses a 30 °C. Verifica-se que os valores dos extratos etanólicos do caule foram maiores que os obtidos nas folhas e aproximadamente o dobro em relação às raízes. Nos extratos aquosos, a quantidade foi bastante semelhante nos três tecidos analisados.

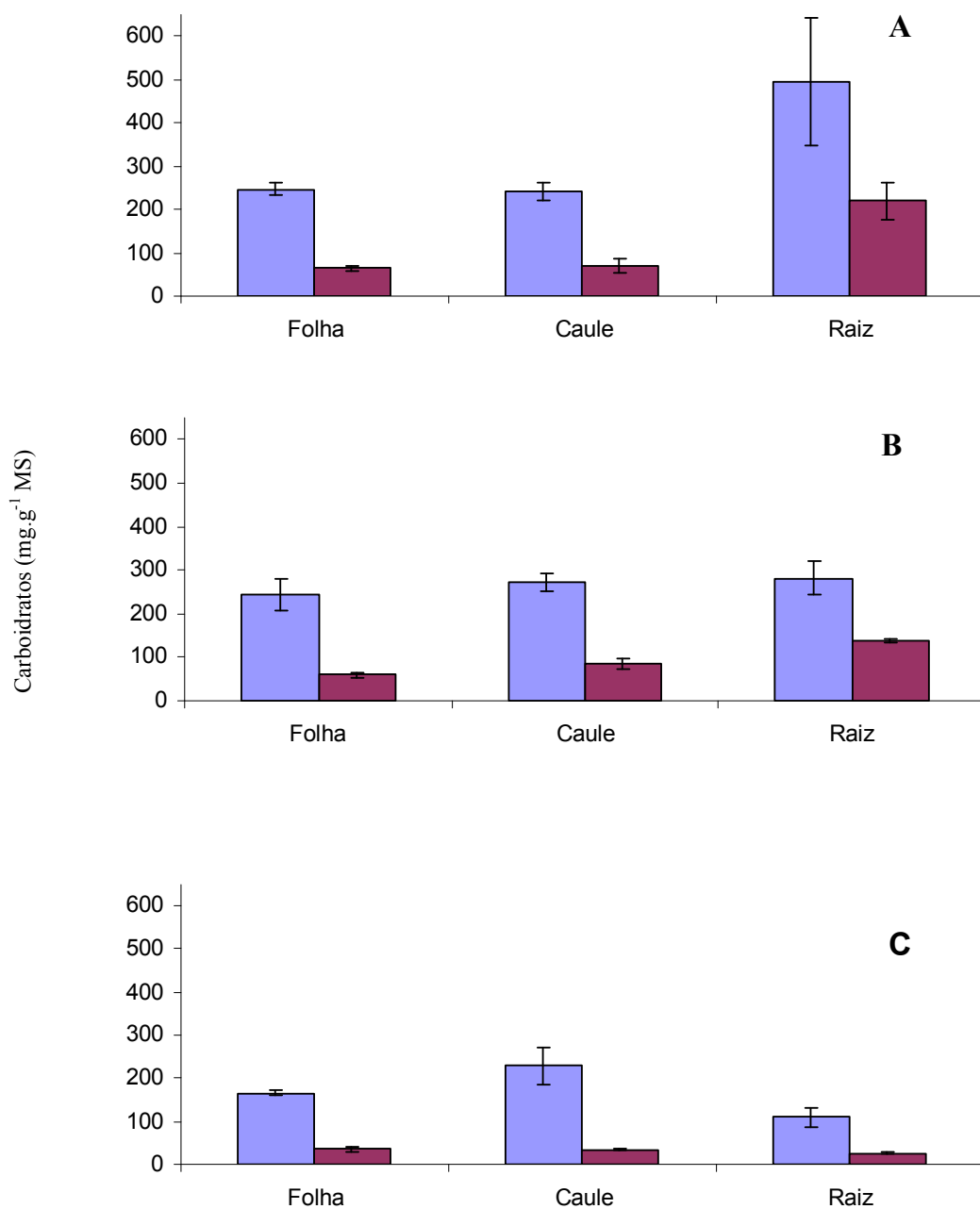


Figura 5. Conteúdo de carboidratos solúveis (mg g⁻¹ MS) em álcool 80% (barras azuis) e em água (barras vermelhas) de diferentes tecidos de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* por 6 meses em câmaras de germinação a 15 °C (A), 15/30 °C (B) e 30 °C (C), sob fotoperíodo de 12 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão (n = 3).

Os carboidratos solúveis dos extratos etanólicos e aquosos brutos de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* em câmaras de germinação por 9 meses estão mostrados na figura 6. Observa-se que nas plantas mantidas a 15 °C (figura 6 A) a quantidade de açúcares presentes nos extratos etanólicos foi semelhante na raiz, caule e folhas, variando entre 100 e 150 mg g⁻¹MS. Contudo, nos extratos aquosos das raízes, o valor foi o dobro ao encontrado na parte aérea.

A figura 6 B mostra a quantidade de açúcares em plantas cultivadas sob termoperíodo de 15 °C/ 30 °C. Observa-se neste tratamento, tanto nos extratos etanólicos quanto nos aquosos, que as quantidades obedeceram ao mesmo padrão de variação, sendo encontrados valores menores nas folhas. No caule, a quantidade foi cerca de 25% maior em ambos extratos, enquanto nas raízes praticamente dobrou em relação ao caule.

Considerando a relação entre raiz e parte aérea, observa-se que a quantidade de açúcares solúveis totais das raízes foi maior do que a da parte aérea em cerca de 30 %, ou seja, numa proporção de 3:2.

A figura 6 C representa a quantidade de açúcares solúveis nas plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* por 9 meses a 30 °C. Verifica-se que os valores dos extratos etanólicos do caule foram cerca de 40 % maiores que os das folhas e aproximadamente o dobro em relação às raízes. Nos extratos aquosos, a quantidade foi semelhante nos três tecidos analisados, sendo levemente maior no caule. A relação entre os açúcares solúveis totais da parte aérea e da parte radicular foi de 3:1.

Na figura 7 estão apresentados os dados relativos às plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro* por 9 meses em Sala de Cultura com temperatura média de 26 °C. Como pode ser observado, em ambas as condições as plantas apresentaram menor quantidade de açúcares que as mantidas em câmara de germinação a 30 °C.

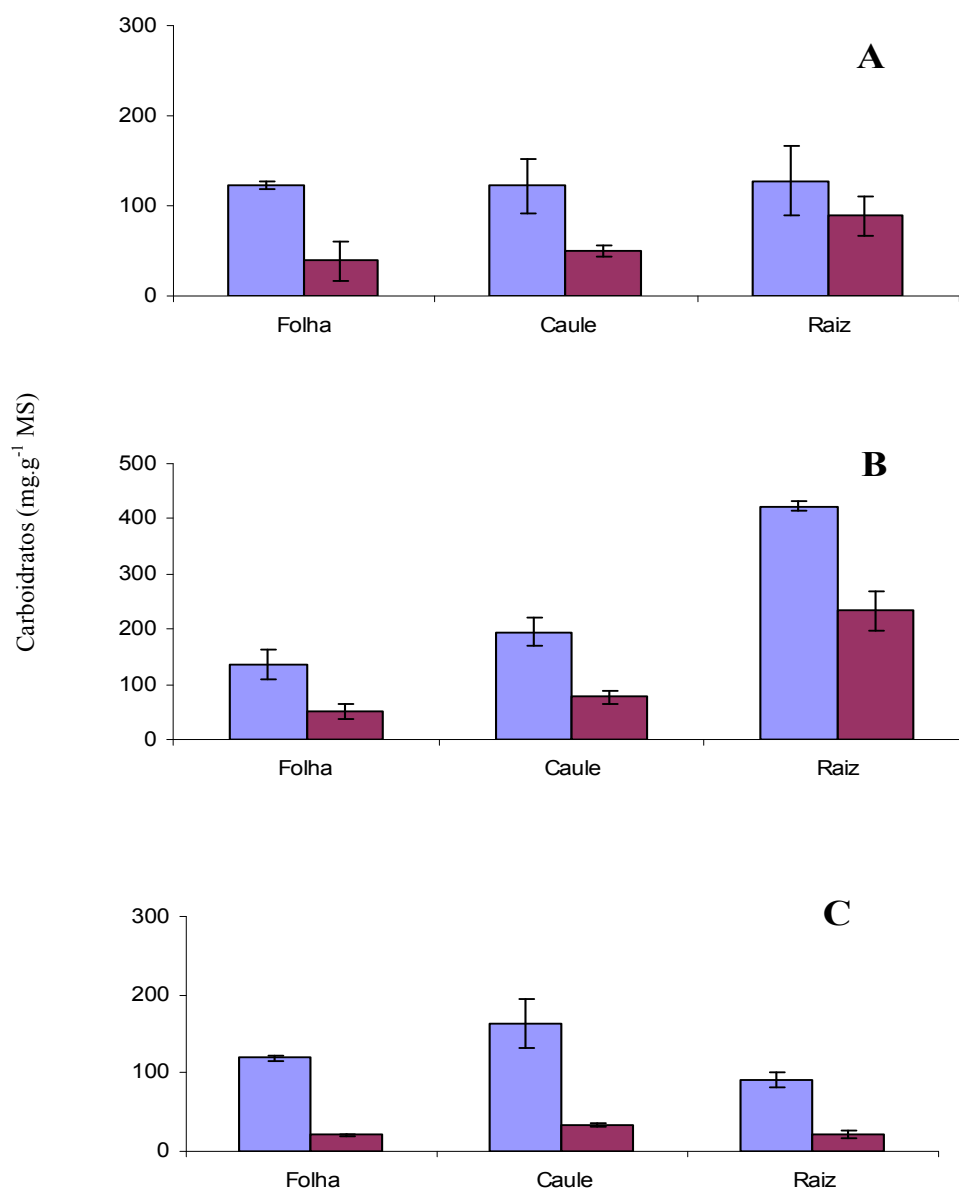


Figura 6. Conteúdo de carboidratos solúveis (mg g⁻¹MS) em álcool (barras azuis) e em água (barras vermelhas) de diferentes tecidos de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* por 9 meses em câmaras de germinação a 15 °C (A), 15/30 °C (B) e 30 °C (C), sob fotoperíodo de 12 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão.

Novamente, a maior quantidade de açúcares foi encontrada nos extratos etanólicos e na parte aérea, exceto nas raízes das plantas cultivadas *ex vitro*, cujas quantidades foram maiores (figura 7 B).

A partir desses dados é possível concluir que em todos os tratamentos com temperatura constante (15 °C, 30 °C e Sala de Cultura), a quantidade de açúcares solúveis na parte aérea foi igual ou superior à das raízes, havendo, entretanto, uma relação inversa nas plantas cultivadas sob termoperíodo (15/30 °C), onde a quantidade de açúcares das raízes ultrapassou a da parte aérea.

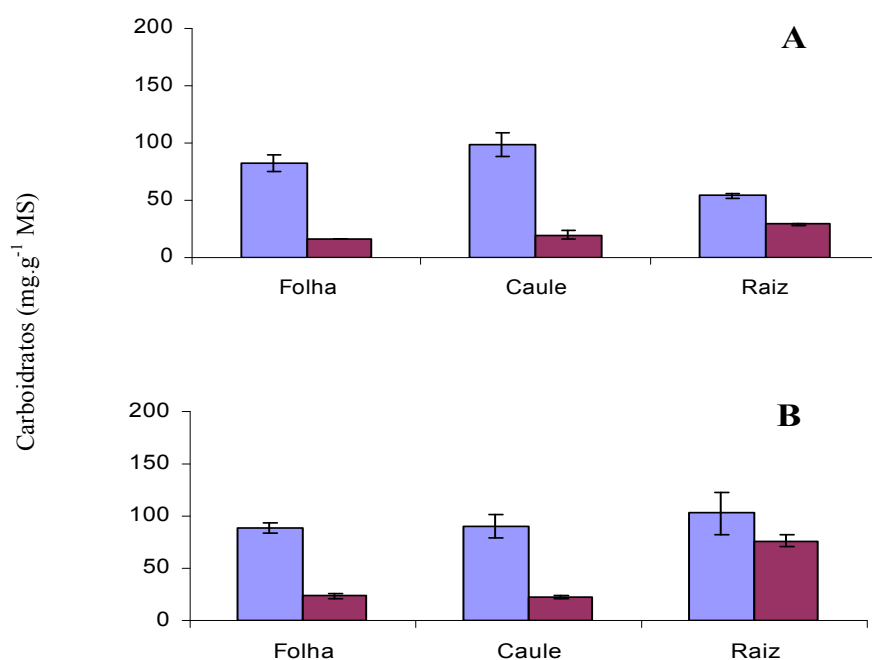


Figura 7. Conteúdo de carboidratos solúveis (mg g⁻¹MS) em álcool (barras azuis) e em água (barras vermelhas) de diferentes tecidos de plantas de *A. imperialis* cultivadas por 9 meses em Sala de Cultura a 26 °C (A) e *ex vitro* a 26 °C (B), sob fotoperíodo de 12 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão.

A análise dos carboidratos solúveis por HPAEC/PAD em plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 9 meses foi realizada por comparação com padrões comerciais autênticos (figura 8) e revelou a presença de *myo*-inositol, glucose, frutose, sacarose, além de dois açúcares não identificados e oligossacarídeos da série da rafinose (rafinose e estaquiose) em proporções variadas, levando-se em consideração o tratamento e o tipo de tecido analisado.

Nos extratos etanólicos de raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas em 15 °C (figura 9 A) foram detectados sinais de *myo*-inositol próximos a 100 nC de resposta e uma quantidade muito pequena de um açúcar ainda não identificado (aqui denominado Ni 1) próximo aos 5 minutos de eluição. Não apareceram sinais de sacarose neste extrato. Glucose e frutose foram detectadas em quantidades muito superiores, sendo que a glucose ultrapassou 500 nC de resposta e a frutose em níveis um pouco inferiores (em torno de 450 nC). Nos extratos etanólicos de raízes de plantas cultivadas em termoperíodo (15/30 °C) (figura 9 C) este padrão se manteve, sendo que os níveis de glicose e frutose apareceram mais elevados, atingindo 600 nC e 500 nC, respectivamente. Nos extratos etanólicos de raízes de plantas cultivadas em 30 °C (figura 9 E) nota-se que os sinais de *myo*-inositol continuaram em torno de 100 nC de resposta e também a sacarose apareceu com mesmos níveis de detecção. Já as proporções de glucose e frutose se inverteram, sendo a glucose detectada com sinal inferior a 400 nC e a frutose com cerca de 450 nC. Nos extratos aquosos de raízes de plantas cultivadas em 15 °C (figura 9 B) foi observada a presença de quantidades maiores de *myo*-inositol e do açúcar Ni 1, chegando a mais de 200 nC de resposta e quantidades muito inferiores de glucose e frutose (menos de 50 nC de resposta). Ni 1 foi encontrado em proporção elevada, o que demonstra que este açúcar tenha maior solubilidade em água do que em álcool. Também neste extrato foram encontrados traços de oligossacarídeos da série da rafinose em torno dos 13 min de eluição.

Em extratos aquosos de raízes de plantas cultivadas em termoperíodo (figura 9 D), *myo*-inositol, glucose e frutose apareceram em níveis de resposta semelhantes (todos em torno de 50

nC) e Ni 1 também foi encontrado em proporção elevada, como nos extratos de plantas cultivadas em 15 °C. Aqui também existem traços de sacarose e de outros oligossacarídeos de série da rafinose. Já nos extratos aquosos de raízes de plantas cultivadas por 9 meses em 30 °C, o padrão de açúcares encontrados foi muito semelhante ao dos extratos etanólicos, com respostas de glucose e frutose sensivelmente inferiores e sacarose pouco superiores.

Quanto aos extratos etanólicos de caules de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas a 15 °C (figura 10 A) e sob termoperíodo (figura 10 C), o padrão dos açúcares foi idêntico ao encontrado nas raízes, mas para as plantas cultivadas a 30 °C (figura 10 E) a proporção de *myo*-inositol ultrapassou a dos demais açúcares; glucose e frutose se equipararam e a sacarose se manteve abaixo do nível de 100 nC de detecção. Nos extratos aquosos de caules de plantas cultivadas em 15 °C (figura 10 B) foram encontradas proporções menores de *myo*-inositol e de outro açúcar não identificado (Ni 2), em elevada concentração. Nas plantas mantidas em termoperíodo (figura 10 D) o extrato aquoso seguiu o mesmo padrão dos extratos de raiz, mas nos extratos de plantas cultivadas em 30 °C (figura 10 F), a proporção de *myo*-inositol continuou muito elevada, praticamente se igualando aos níveis de glucose. Um fato que chama a atenção é que tanto nos extratos de caule (figura 10 E, F) quanto nos de folhas (figura 11 E, F), as proporções de glucose e frutose foram se invertendo em relação ao que foi observado nas raízes (figura 9 E, F) de plantas cultivadas em 30 °C, sendo que a glucose passou a apresentar níveis mais elevados do que os de frutose. Assim, nas raízes a quantidade de *myo*-inositol foi inferior à da parte aérea e as proporções de glucose e frutose se inverteram nas folhas em relação às raízes.

Outro fato que pode ser observado é que nos extratos aquosos de folhas de plantas mantidas a 15 °C (figura 11 B) não apareceu o componente Ni 2, que foi encontrado nos extratos de caule no mesmo tratamento térmico (figura 10 B), voltando a mostrar níveis elevados do componente Ni 1.

Ressalta-se que os açúcares da série da rafinose foram mais evidentes nas plantas cultivadas sob baixas temperaturas, sugerindo sua ação crioprotetora, como tem sido proposto para outras plantas que vivem em ambientes sujeitos a grande variação térmica, especialmente temperaturas baixas no outono e temperaturas subzero no inverno.

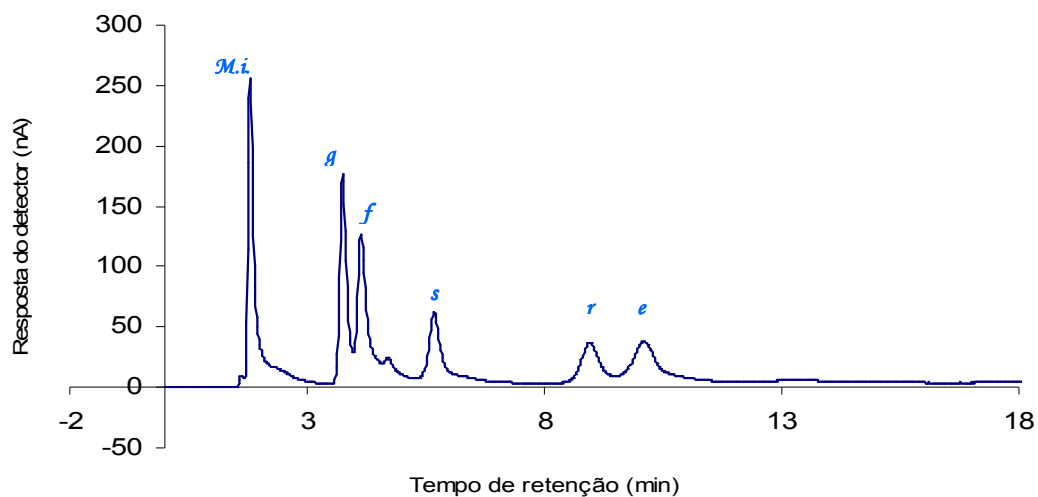


Figura 8. Análise por HPAEC/PAD de padrões comerciais de carboidratos solúveis, onde *Mi* – myo-inositol, *g* – glucose, *f* – frutose, *s* – sacarose, *r* – rafinose, *e* – estaquiase.

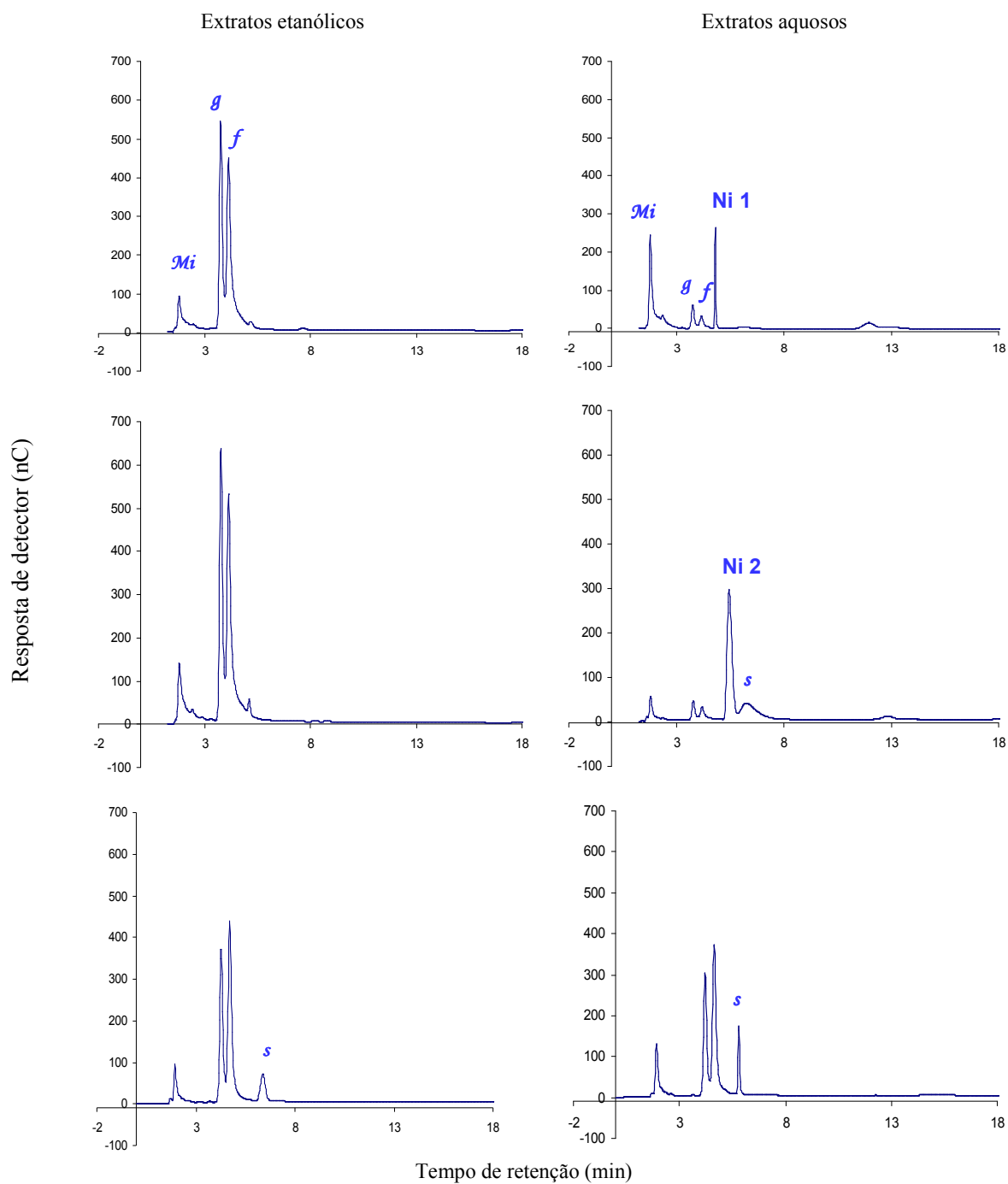


Figura 9. Análise por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis neutros em raízes de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* por 9 meses a 15 °C (A, B), 15/30 °C (C, D) e 30 °C (E, F). *Mi* – *myo*-inositol, *g* – glucose, *f* – frutose, *s* – sacarose, Ni 1 e Ni 2 – açúcares não identificados.

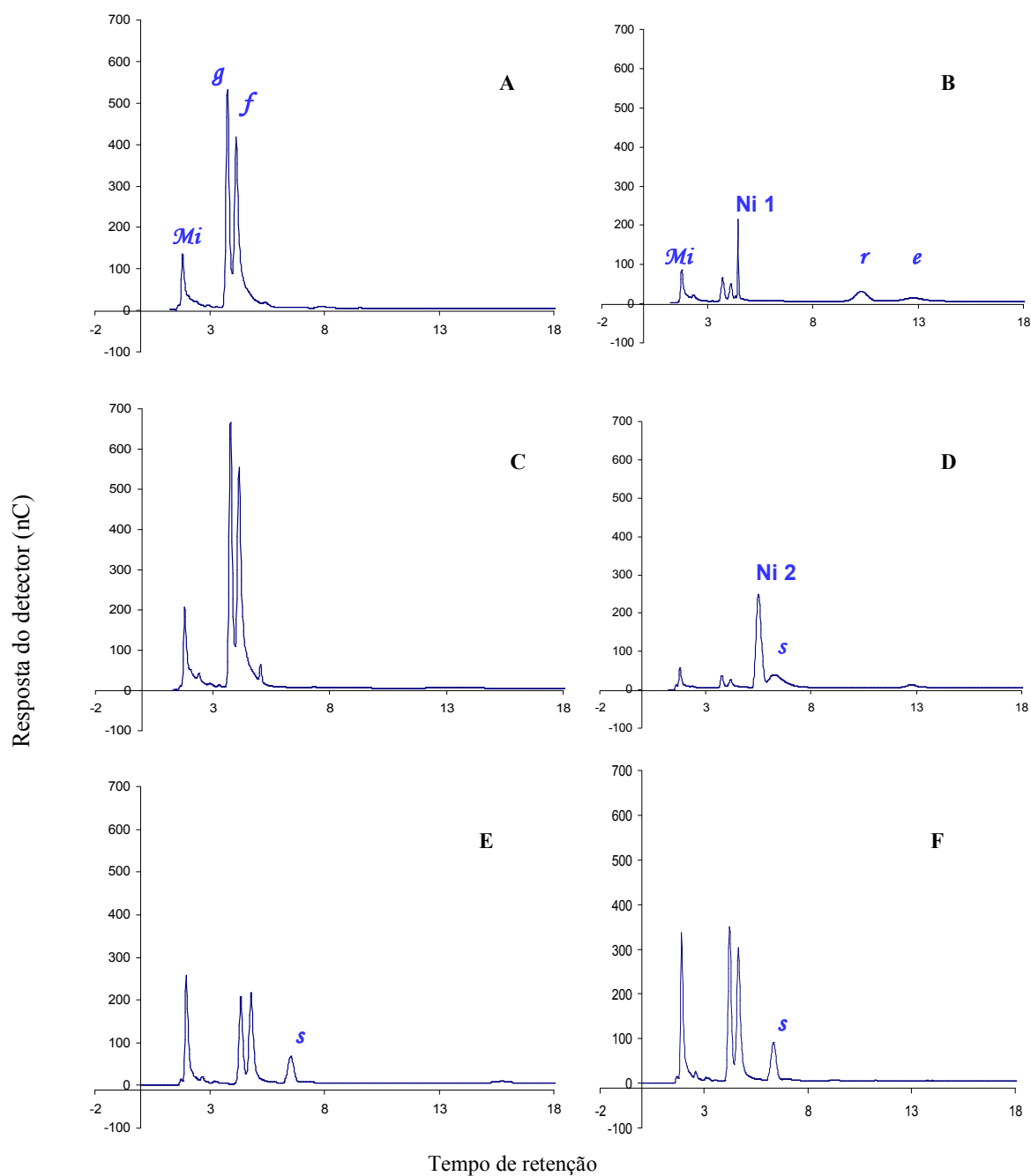


Figura 10. Análise por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis neutros em caules de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* por 9 meses a 15 °C (A, B), 15/30 °C (C, D) e 30 °C (E, F). *Mi* – *myo*-inositol, *g* – glucose, *f* – frutose, *s* – sacarose, *r* – rafinose, *e* – estaquiose e Ni 1 e Ni 2 – açúcares não identificados.

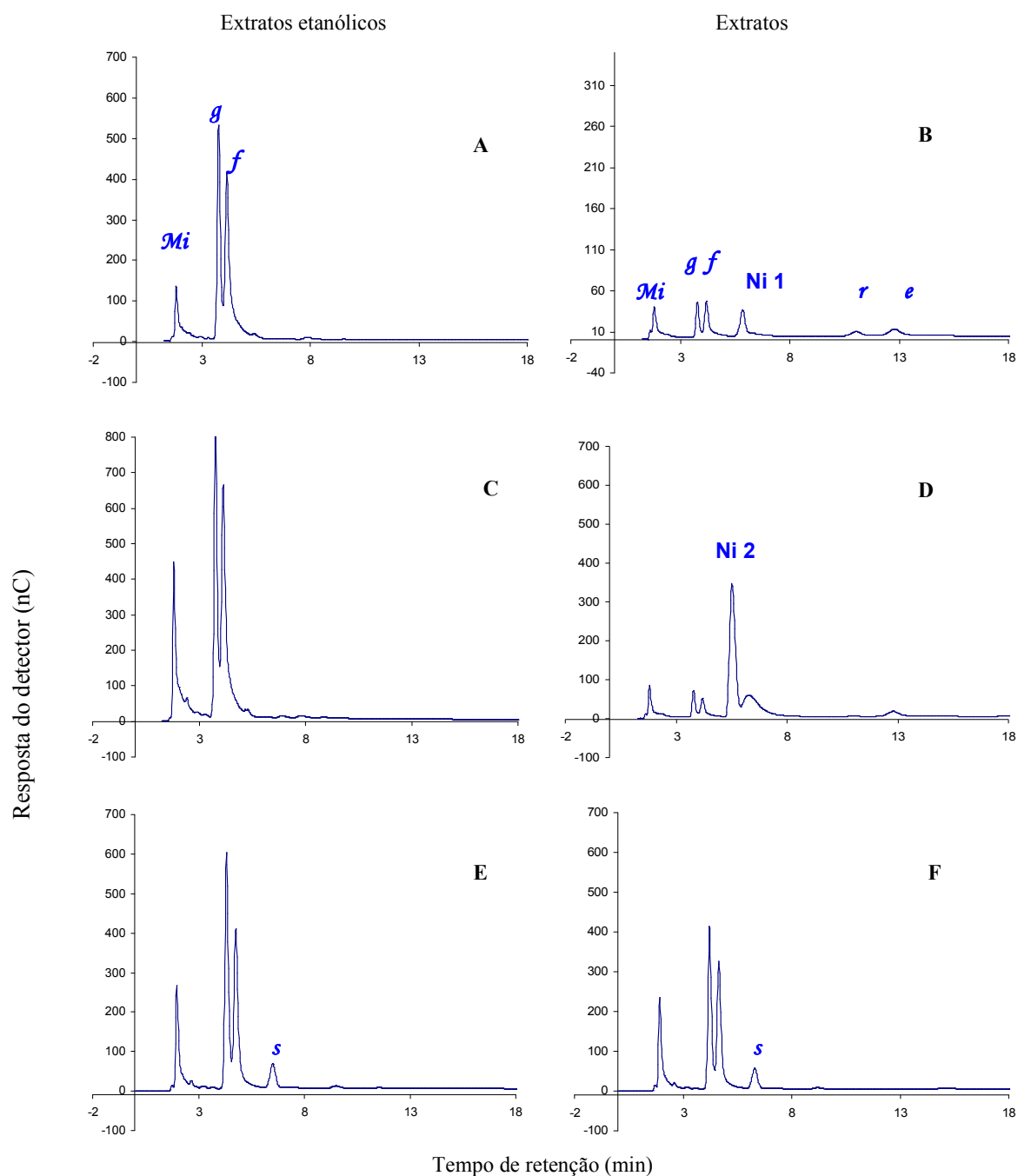


Figura 11. Análise por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis neutros em folhas de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* por 9 meses a 15 °C (A, B), 15/30 °C (C, D) e 30 °C (E, F). *Mi* – *myo*-inositol, *g* – glucose, *f* – frutose, *s* – sacarose, *r* – rafinose, *e* – estaquiose e Ni 1 e Ni 2 – açúcares não identificados.

Para complementar as análises realizadas por HPAEC/PAD, e como tentativa para identificar os carboidratos solúveis presentes nas amostras de *A. imperialis*, foi realizada uma análise por TLC e os resultados estão mostrados na figura 12, confirmando a presença dos mesmos componentes já detectados por HPAEC. Na análise por TLC, houve predominância de açúcares de menor peso molecular, chamando a atenção a possível presença de trealose, que poderia ser o componente Ni 1, presente nas plantas cultivadas sob temperaturas baixas. As presenças de polissacarídeos retidos na origem dos cromatogramas e de rafinose foram mais evidenciadas nos extratos aquosos de plantas cultivadas a 15 °C e sob termoperíodo, confirmando a análise por HPAEC/PAD.

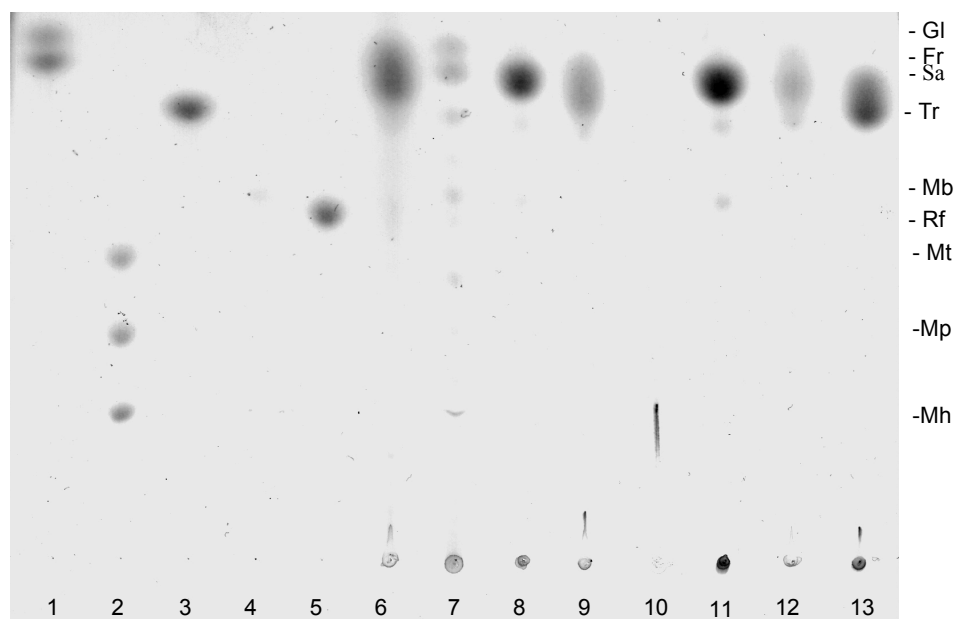


Figura 12. Cromatografia em camada delgada dos carboidratos solúveis de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* em diferentes tratamentos térmicos, em comparação com padrões comerciais. (1) = Gl – glucose, Fr – frutose, Sa – sacarose; (2) = Mt – maltotetraose, Mp – maltopentaose, Mh – maltoheptaose; (3) = Tr – trealose; (4) = Mb – melibiose; (5) = Rf – rafinose; (6) = extrato etanólico de folha em 15 °C; (7) = extrato aquoso de folha em 15 °C; (8) = Extrato aquoso de folha em termoperíodo; (9) = extrato aquoso de folha em 30 °C; (10) = extrato aquoso de caule em 15 °C; (11) = extrato aquoso de caule em termoperíodo; (12) = extrato aquoso de caule em 30 °C e (13) = extrato aquoso de raiz a 15 °C.

A figura 13 apresenta as variações no conteúdo de amido determinado por método enzimático nos diferentes órgãos das plantas de *Alcantarea imperialis* mantidas *in vitro* nas câmaras de germinação por 9 meses, nos diferentes tratamentos térmicos estudados (15 °C, 15 °C escuro/30 °C claro e 30 °C).

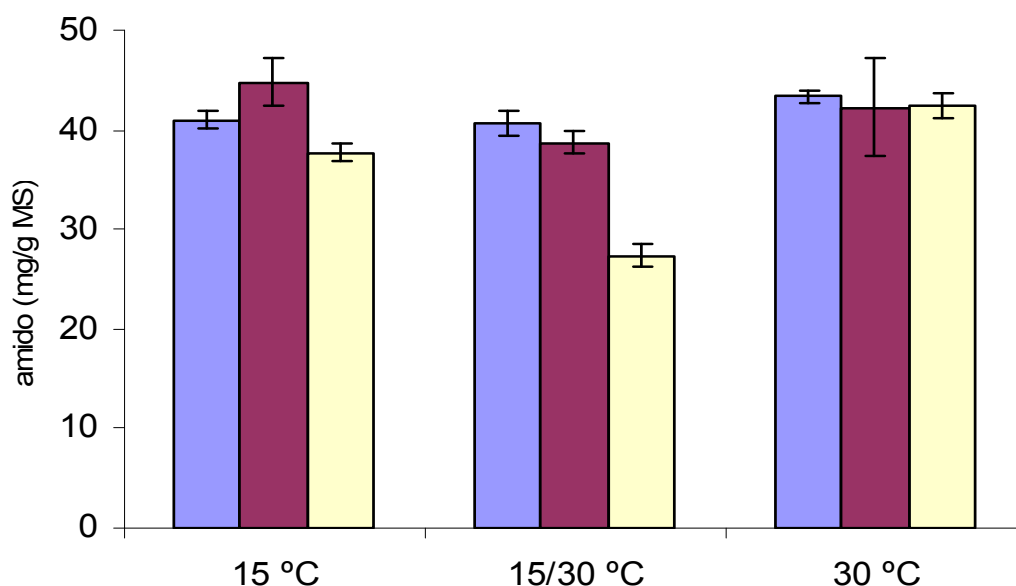


Figura 13. Conteúdo de amido ($\text{mg g}^{-1}\text{MS}$) em folhas (barras azuis), caule (barras vermelhas) e no sistema radicular (barras amarelas) de plantas de *A. imperialis* cultivadas por 9 meses *in vitro* em câmaras de germinação sob diferentes temperaturas. As barras verticais indicam o desvio padrão.

Como pode ser observado, nos tratamentos com temperaturas mais baixas (15 °C e 15/30 °C) houve predominância de amido na parte aérea das plantas após 9 meses de cultivo. Nas mantidas a 30 °C as quantidades de amido foram uniformes em todos os tecidos analisados (sistema radicular, caule e folhas), enquanto que naquelas mantidas sob termoperíodo a diferença nos teores de amido entre o sistema radicular e a parte aérea tornou-se muito mais pronunciada. Além disso, estas plantas apresentaram menores quantidades de amido, especialmente nas raízes

quando comparadas com as que foram mantidas em temperaturas constantes, tanto em 15 °C quanto em 30 °C. Também é interessante ressaltar que sob temperaturas mais baixas (15 °C e termoperíodo) o sistema radicular concentrou menor quantidade de amido, o que poderia indicar que os carboidratos não-estruturais nessa espécie se concentram na parte aérea das plantas.

Discussão

Foram encontradas variações expressivas nas quantidades de açúcares solúveis na parte aérea e no sistema radicular de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas por 9 meses nos diferentes tratamentos térmicos estudados. Sob temperaturas mais elevadas, tanto *in vitro* (câmaras de germinação a 30 °C e Sala de Cultura a 26 °C) quanto *ex vitro* houve tendência a menor quantidade de açúcares solúveis do que sob temperaturas mais baixas (15 °C e termoperíodo 15/30 °C). Quanto ao amido, esta relação se inverteu, particularmente para o sistema radicular.

Considerando que a maior concentração de massa nas plantas de *A. imperialis* encontra-se na parte aérea (somando-se caule e folhas) verifica-se que a maior quantidade absoluta de açúcares solúveis totais foi alocada para a parte aérea.

Segundo Berry & Björkman (1980), plantas de uma mesma espécie crescendo em habitats variados estão sujeitas a variações sazonais de temperatura, podendo também haver consideráveis flutuações desse fator num único dia. Nessas condições a fotossíntese é fortemente afetada, assim como todos os processos de desenvolvimento e o metabolismo. Como a maior parte do carbono fixado na fotossíntese é utilizada para 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 *A. imperialis* cultivadas sob diferentes tratamentos térmicos.

As flutuações sazonais nas concentrações de açúcares solúveis em plantas perenes de regiões temperadas são bem conhecidas, havendo geralmente aumento nesses compostos no outono e inverno. O açúcar livre mais abundante e mais frequentemente acumulado em resposta à baixa temperatura é a sacarose. Glucose e frutose podem ser acumuladas em menores quantidades, assim como os oligossacarídeos derivados da sacarose rafinose e estaquiose também podem ser acumulados no inverno, mas geralmente nenhum deles ocorre em quantidades significativas no verão, como citado para *Hedera helix* por Guy *et al.* (1992).

Ainda segundo Guy *et al.* (1992), um propósito para o acúmulo de sacarose durante a aclimação ao frio é indicado pelo fato da concentração de sacarose ser frequentemente correlacionada com a tolerância ao congelamento. Como agente crioprotetor, o acúmulo de sacarose poderia ser adaptativo e constituir o principal fator para tornar a planta mais tolerante a baixas temperaturas (Levitt 1980). Assim, a necessidade de um período de frio para hidrólise dos carboidratos de reserva e mobilização de açúcares necessários ao crescimento, impede que as plantas tenham grande desenvolvimento no outono, garantindo a sobrevivência no inverno (Charles-Edwards & Rees 1974). A tolerância a temperaturas baixas também tem sido associada às variações nos níveis de carboidratos em plantas tropicais (Figueiredo-Ribeiro 1980).

Segundo Taiz & Zeiger (2004), espécies tropicais e subtropicais são mais suscetíveis a injúrias por resfriamento do que as de clima temperado. Quando as raízes dessas plantas são submetidas a temperaturas entre 15 e 10 °C ocorrem vários danos, que incluem crescimento mais lento, clorose e murcha. No presente estudo (Capítulo 1), foi observado que as temperaturas baixas (15 °C constante e termoperíodo de 15/30 °C) inibiram o crescimento de plantas de *A. imperialis*, particularmente quanto ao comprimento e número de raízes e folhas. Notou-se, também, que as plantas mantidas em temperaturas mais baixas concentraram maior biomassa na parte aérea (caule e folhas) do que no sistema radicular. Esses dados estão de acordo com o fato de *A. imperialis* ser uma espécie rupícola, na qual as folhas desempenhariam funções

metabólicas de produção e acúmulo de reservas, enquanto as raízes teriam como principal função o suporte da planta (Nievola & Mercier 1996, De Paula 1998, Endres & Mercier 2000, Nievola *et al.* 2001, Endres & Mercier 2002 e Takahashi *et al.* 2007).

A proteção celular ao resfriamento pode ser feita por carboidratos e algumas proteínas específicas, crioprotetores que estabilizam proteínas e lipídios das membranas durante a desidratação induzida por temperaturas baixas. Por exemplo, plantas de trigo acumulam sacarose sob temperaturas baixas e outros cereais de inverno também acumulam açúcares solúveis, inibindo a formação de cristais de gelo nas células. Dessa forma, açúcares como sacarose, rafinose, frutanos, sorbitol ou manitol, dentre outros, contribuem para a proteção celular contra as baixas temperaturas (Taiz & Zeiger 2004).

A análise das amostras por TLC permitiu confirmar a predominância de açúcares de menor peso molecular em todos os tecidos, chamando a atenção a possível presença de trealose, um dissacarídeo não redutor, formado por duas moléculas de glicose, que tem sido isolado de algas, bactérias, fungos, insetos, invertebrados e leveduras (Elbein 1974 *in* Goddijn & Smeekens 2008). Segundo estes autores, provavelmente a presença de intensa atividade da trealase em todos os tecidos vegetais evita o acúmulo de trealose, dificultando sua identificação, o que pode ter sido o motivo de não serem encontrados estudos sobre este açúcar em plantas até um passado não muito distante. Em virtude dos baixos teores de trealose nas plantas, parece improvável que a ela tenha uma função importante na proteção contra o estresse. Existem estudos que sugerem que a trealose seja um agente que venha a impedir simbiose entre plantas suscetíveis e microorganismos produtores de trealose (Mellor 1992). Vogel *et al.* (1998) sugerem que a trealose ou metabólitos a ela relacionados poderiam ter função de reguladores de crescimento vegetal e desenvolvimento. A biossíntese de trealose em plantas pode desempenhar um papel na regulação do metabolismo de carboidratos ou na percepção da disponibilidade de carboidratos (Goddijn & Smeekens 2008). Nas plantas de *A. imperialis* cultivadas sob termoperíodo e 15 °C foi detectada a presença de açúcares

que migraram próximo à sacarose (designados Ni 1 e Ni 2), confirmando as análises realizadas por HPAEC/PAD. A identificação destes compostos somente poderá ser feita após a realização de análises químicas dessas amostras por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/MS), que estão em andamento. Também na análise por TLC ficou clara a presença de oligossacarídeos possivelmente da série da rafinose, mais evidenciados nas amostras de plantas cultivadas a 15 °C e sob termoperíodo, confirmando o que foi detectado por HPAEC/PAD.

Quando plantas tolerantes ao frio são submetidas a temperaturas baixas ocorrem alterações em diversos processos fisiológicos e metabólicos, que por sua vez afetam os níveis de carboidratos (Guy *et al.* 1992). No inverno, o conteúdo de amido tipicamente declina e os açúcares livres exibem um aumento direto na quantidade. Embora algumas dessas respostas à baixa temperatura possam ser vistas como uma consequência incidental, isso leva a mudanças na composição dos carboidratos não-estruturais e na redistribuição do amido em muitas espécies. Em plantas menos tolerantes ao frio, como *Solanum* sp e *Citrus* sp, ao contrário, ocorre acúmulo de amido sob temperaturas baixas, juntamente com aumento de açúcares livres (Guy *et al.* 1992).

Segundo Kaplan *et al.* (2006), desde o século passado é sabido que temperaturas baixas estimulam a redução do teor de amido e o simultâneo aumento de açúcares solúveis em plantas e que este aumento parece estar associado à tolerância ao frio em muitas espécies. Essas informações estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho que indicaram tendência a haver maiores quantidades de açúcares solúveis nas plantas de *A. imperialis* cultivadas sob temperaturas baixas (15 °C e 15/30 °C), do que nas cultivadas a 30 °C. É interessante notar que sob termoperíodo (15 °C escuro/30 °C claro), os níveis de açúcares foram muito aumentados (tanto no sistema radicular quanto no eixo caulinar), indicando que esta seria a condição em que *A. imperialis* teria a maior produção de açúcares solúveis totais, concordando com a literatura. De acordo com Martin (1994), as temperaturas mais baixas no período escuro estimulam a absorção de CO₂ em Bromeliaceae, família na qual existem representantes C₃, CAM e C₃-CAM.

Aproximadamente dois terços das bromélias são plantas CAM e ocupam locais áridos ou são epífitas. Essas plantas são capazes de sobreviver em condições de falta de água, bem como em ambientes com elevada energia luminosa e grande amplitude térmica (Kluge & Ting 1978) e sua adaptação a estas condições pode estar relacionada às variações nas concentrações de vários compostos, incluindo-se os carboidratos (Salisbury & Ross 1991, Larcher 2006).

Como já mencionado, nas plantas CAM a fotossíntese é ótima quando são submetidas a temperaturas amenas durante o período diurno e mais baixas no período noturno, o que provavelmente deve ter ocorrido com *A. imperialis*, já que houve aumento no conteúdo de carboidratos não-estruturais (amido) na parte aérea das plantas cultivadas sob termoperíodo de 15/30 °C. Em plantas de *Ananas comosus* cultivadas sob temperaturas constantes a quantidade de CO₂ absorvida é menor e a máxima atividade fotossintética ocorreu sob regime termoperiódico de 15 °C noite/30 °C dia (Martin 1994), como um dos tratamentos utilizados no presente trabalho para cultivo *in vitro* de plantas de *A. imperialis*.

Observamos que as plantas de *A. imperialis* cultivadas sob temperaturas mais elevadas (30 °C constante) apresentaram maior conteúdo de amido no sistema radicular, quando comparadas com as cultivadas a 15 °C. Contudo, na condição de termoperíodo, as plantas apresentaram as menores concentrações de amido, havendo, portanto, uma relação inversa do que ocorreu com os açúcares solúveis. O aumento destes poderia estar relacionado com a redução do crescimento das plantas observada sob temperaturas baixas, bem como com a possível hidrólise do amido armazenado. O acúmulo de açúcares solúveis poderia proporcionar a proteção das plantas ao frio.

Literatura citada

- Ali, I. A., Kafkafi, I., Yamaguchi, Y., Sugimoto, Y. & Inanaga, S.** 1996. Effects of low root temperature on sap flow rate, soluble carbohydrates, nitrate contents and on cytokinin and gibberellin levels in root xylem exsudate of sand-grown tomato. *Journal of Plant Nutrition* 19: 619-634.
- Amaral, L. I. V., Costa, P. M. F., Aida, M. P. M., Gaspar, M. & Buckeridge, M. S.** 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34: 425-431.
- Andreas, K.** 2006. Growing *Alcantarea* Species: Illustrating Terrie Bert's Article. Newsletter of the Bromeliad Society of Central Florida 32 (02).
<http://fcbs.org/newsletters/BSCF/022006.pdf> consultado em 16/12/2008.
- Berry, J. & Björkman, O.** 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 491-543.
- Browse, J. & Xin, Z.** 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 241-246.
- Carvalho, M. A. M. & Dietrich, S. M.** 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Charles-Edwards, D. A. & Rees, A. R.** 1974. A simple model for the cold requirement of Tulip. *Annals of Botany* 38: 401-408.
- De Paula, C. C.** 1988. Cultivo de bromélia para fins comerciais ou hobby. CPT, Viçosa. 74p.
- 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.

- Endres, L. & Mercier, H.** 2000. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. *Journal of Plant Physiology* 15: 205-212.
- Endres, L. & Mercier, H.** 2003. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 (2003) 181-187.
- Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1980. Variações fisiológicas e metabólicas no xilopódio de *Ocimum nudicaule* Benth. var. *anisifolium* Giul. em diferentes estádios fenológicos. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- Goddijn, O. & Smeekens, S.** 2008. Sensing trehalose biosynthesis in plants. Mini Review. *The Plant Journal* 14: 143-146.
- Gupta, A. K. & Kaur, N.** 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* 30: 761-776.
- 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.
- Islam, M. T., Dembele, D. P. & Keller, E. R. J.** 2005. Influence of 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.
- Jimenez, R. M. & Caballero, M. R.** 1990. El cultivo industrial de plantas en maceta. Reus: Ediciones de Horticultura, 664p.
- Kanaya, K.I., Chiba, S. & Shimomura, T.** 1978. Thin-layer chromatography of linear oligosaccharides. *Agr. Biol. Chem.* 42: 1947-1948.
- Kaplan F., Sung D.Y. & Guy C.L.** 2006. Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum* 126: 120-128.

- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N. & Heyer, A. G.** 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment* 27: 1395-1404.
- Kluge, M. & Ting, I. P.** 1978. Crassulacean acid metabolism. Analysis of an Ecological Adaptation. Springer-Verlag Berlin – Heidelberg, Germany. 209p.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa, São Carlos, SP, 398p.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighrhart, B., Crowe, J. H. & Crowe, L. M.** 1995. Threalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3592-3597.
- Levitt, J.** 1980. Responses of plants to environmental stresses, vol 1. Academic Press, New York.
- Majerowicz, N.** 2008. Fotossíntese. pp. 82-133. *in* Kerbaudy, G.B. *Fisiologia Vegetal* – 2ª. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Martin, C.E.** 1994. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. *The Botanical Review* 60: 1-82.
- Mellor, R.B.** 1992. Is trehalose a symbiotic determinant in symbioses between higher plants and microorganisms? *Symbiosis* 12: 113-129.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- Nievola, C. C. & Mercier, H.** 1996. The Importance of leaf and root systems in nitrate assimilation in *Vriesea fosteriana*. *Bromelia* 3:14-18.
- Nievola, C. C., Mercier, H. & Majerovicz, N.** 2001. Levels os nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 1387-1398.

- 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 grown *in vitro*. In *Vitro Plant Cellular & Developmental Biology* 41: 832-837.
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W.** 1991. *Plant Physiology*. 4th ed. California; Wadsworth Publishing Company, 1991. 682p.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. *Plant Physiology* – 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, MA, USA. 792 p.
- Takahashi, C. A., Ceccantini, G. C. T. & Mercier, H.** 2007. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19:119-126.
- Vogel, G., Aeschbacher, R. A., Müller, J., Boller, T. & Wiemken, A.** 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: Identification by functional complementation of the yeast tps 2 mutant. *Plant Journal* 13: 673-683.
- Wanner, L.A. & Juntilla, O.** 1999. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120:390-399.

Considerações finais

Alcantarea imperialis é nativa da Serra dos Órgãos (RJ), apresenta grande plasticidade a variações de temperatura e está incluída na lista de espécies em perigo de extinção, devido ao intenso extrativismo causado pelo comércio irregular de plantas ornamentais.

O presente trabalho surgiu da necessidade de se estabelecer um cultivo de plantas de *Alcantarea imperialis* com crescimento lento, como uma alternativa aos bancos de semente, uma vez que as sementes desta espécie têm curta longevidade, inviabilizando sua conservação nesses bancos. Em condições naturais, as plantas de *A. imperialis* atingem a maturidade reprodutiva entre 10 e 20 anos e após a dispersão suas sementes têm a viabilidade drasticamente diminuída, podendo ser conservadas no máximo por 12 meses, o que amplia o grau de ameaça a esta espécie e justifica a manutenção da mesma em uma coleção *in vitro*.

O cultivo *in vitro*, sob temperatura baixa como uma forma de promover o crescimento lento a partir de sementes, para garantir a conservação de coleções com grande variabilidade genética, se torna uma ferramenta adequada para estudos de conservação de espécies ameaçadas de extinção, uma vez que garante o controle rígido das variáveis a serem analisadas (como temperatura, iluminação, nutrientes, etc.), além de controlar a qualidade fitossanitária das plantas. Para que este tipo de cultivo seja estabelecido com sucesso, existe a necessidade de avaliar se a espécie em questão se mantém nessas condições sem alterar significativamente seu metabolismo e a morfologia em relação às que se encontram na natureza ou que são produzidas de modo convencional. Dessa maneira, no presente trabalho foram analisadas a sobrevivência das plântulas, o crescimento da parte aérea e do sistema radicular e a produção de carboidratos em plantas de *Alcantarea imperialis* de modo a avaliar se suas características morfo-fisiológicas e metabólicas são mantidas quando cultivadas *in vitro* nessas condições.

Pelos resultados obtidos foi constatado que em todos os tratamentos térmicos utilizados *in vitro* em câmaras de germinação (15 °C, 15/30 °C e 30 °C) e em condições de Sala de Cultura (26 °C) *in vitro* ou *ex vitro*, a porcentagem final de germinação não foi alterada. Também o número e o comprimento de raízes e folhas não foram afetados, evidenciando que a morfologia das plantas foi mantida, sendo que somente a velocidade de crescimento foi diminuída sob temperaturas mais baixas. As plantas que foram mantidas a 30 °C ou 26 °C (Sala de Cultura) eram maiores do que as cultivadas em 15 °C, enquanto que as mantidas sob termoperíodo (15/30 °C) apresentavam tamanhos intermediários durante todo o período de cultivo analisado. Quando comparadas as plantas cultivadas *in vitro* com as cultivadas *ex vitro* (controle), verificamos que as mesmas apresentavam o mesmo padrão morfológico, indicando a viabilidade deste tipo de cultivo para *A. imperialis*.

As análises relativas à produção de carboidratos, tanto quantitativas quanto qualitativas, indicaram que sob temperaturas mais baixas houve mobilização desses compostos, com aumento dos açúcares solúveis de peso molecular menor, incluindo oligossacarídeos da série da rafinose, que segundo a literatura poderiam estar relacionados com o aumento da tolerância ao frio, como ocorre em diversas espécies.

Como era esperado, já que *A. imperialis* é uma espécie rupícola ou saxícola, sujeita a grandes variações de temperatura, podendo variar de 5 a 40 °C em um único dia, as alterações mais expressivas nos carboidratos foram observadas no tratamento termoperiódico (15/30 °C), indicando que esta condição é a que mais se aproxima do ambiente em que essas plantas ocorrem na natureza, evidenciando ainda que os carboidratos produzidos nesta condição possam estar envolvidos na proteção das plantas ao frio.

As análises quantitativas apontaram também variações expressivas no conteúdo de amido nos diferentes tecidos analisados de plantas cultivadas nos diferentes tratamentos térmicos. Em temperaturas mais elevadas foram encontradas as maiores quantidades de amido e os menores

conteúdos de açúcares solúveis, enquanto que sob temperaturas baixas esta relação se inverteu, havendo diminuição de amido e aumento de açúcares solúveis.

Este trabalho mostrou que a maior quantidade de açúcares solúveis foi alocada para a parte aérea da plantas de *A. imperialis*. Nessa região também houve a maior concentração de massa, indicando que o eixo caulinar seja o principal centro metabólico, sendo responsável pela produção e acúmulo de reservas, enquanto o sistema radicular teria como função principal o suporte da planta. Esse resultado está de acordo com a literatura que mostra que as raízes das bromélias estão relacionadas principalmente com a fixação da planta, seja ela epífita ou rupícola, cabendo à parte aérea as funções de absorção e fotossíntese e acúmulo de reservas. De maneira interessante, a maior quantidade de açúcares na parte aérea de plantas de *A. imperialis* quando submetidas ao frio ressalta as peculiaridades existentes nas bromeliáceas, diferentemente de outras famílias, nas quais a quantidade dos açúcares nessas condições geralmente é armazenada no sistema subterrâneo.

Como fartamente documentado na literatura consultada, a proteção ao resfriamento pode ser feita por carboidratos e proteínas específicas, por meio da estabilização de lipídios e proteínas da membrana celular durante a desidratação induzida por temperaturas baixas. Sendo assim, açúcares de pesos moleculares menores (como glucose, frutose, sacarose, trealose e rafinose, bem como outros está em fase de identificação) foram encontrados nas plantas de *A. imperialis* em quantidades mais expressivas naquelas cultivadas sob temperaturas mais baixas, e poderiam estar relacionados com a tolerância dessas plantas ao frio. A confirmação da presença desses açúcares ainda não identificados poderá auxiliar na compreensão do papel dos carboidratos não-estruturais na adaptação de plantas de *Alcantarea imperialis* a ambientes com grandes amplitudes térmicas diárias. Este trabalho evidenciou, também, a tolerância da espécie a condições de temperaturas baixas constantes, como usualmente utilizadas em bancos de germoplasma.

A verificação da plasticidade de *A. imperialis* em relação à temperatura pode contribuir para futuros estudos que visem à investigação de mecanismos fisiológicos relacionados à

sobrevivência em ambientes considerados estressantes, como aquele onde essa bromélia habita. O fato desta espécie sobreviver em condições extremas de seca, alta irradiância e escassez de nutrientes, pode apontar para a utilização dessa bromélia como um interessante modelo para estudos de fisiologia básica.

RESUMO

Bromeliaceae inclui representantes com notável plasticidade em relação ao ambiente (de mesófilos a xéricos), especialmente em regiões com grande amplitude térmica. Pela beleza que apresentam, essas plantas se destacam entre as principais espécies ornamentais tropicais, incluindo a bromélia imperial *Alcantarea imperialis*. Esta espécie é nativa da Mata Atlântica e cresce naturalmente sobre rochas ou solos rasos e pedregosos em regiões com temperaturas médias de 19 °C, que podem oscilar entre 5 e 40 °C em um único dia. Considerando que o crescimento de plantas é diminuído sob baixas temperaturas e que nessas condições há aumento na produção de carboidratos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e as variações nos carboidratos não estruturais em plantas de *A. imperialis* crescendo sob diferentes condições térmicas. O cultivo foi estabelecido a partir de sementes germinadas *in vitro* em meio Murashige & Skoog (1962) sólido, com macronutrientes reduzidos à metade, (100 mg/L de *myo*-inositol, 30 g/L de sacarose, 7 g/L de agar, pH 5,8), modificado a partir de Naves (2001), em câmaras de germinação tipo BOD, com fotoperíodo de 12 h, a 15 °C, 15/30 °C (termoperíodo escuro/claro) e 30 °C. Um lote controle foi mantido *in vitro* a 26 °C em sala de cultura e outro em estufa, utilizando casca de pinus como substrato. A emergência das plântulas foi avaliada semanalmente em cada tratamento e após 3, 6 e 9 meses de cultivo foram realizadas análises biométricas e de produção de carboidratos não estruturais no sistema radicular, folhas e eixo caulinar, constituído de caule e bainha das folhas. Os resultados indicaram que foram necessários 50 dias para ocorrer emergência de 80% das plântulas provenientes de sementes mantidas a 15 °C, enquanto que naquelas cultivadas a 30 °C foram necessários apenas 14 dias para que a mesma porcentagem fosse atingida. As sementes mantidas sob termoperíodo precisaram de um tempo intermediário para germinar, cerca de 21 dias. As plantas mantidas por 9 meses a 15 °C apresentaram folhas e raízes em número e tamanho reduzidos e menores valores de massas fresca e seca, sendo em média 4 vezes inferiores àquelas

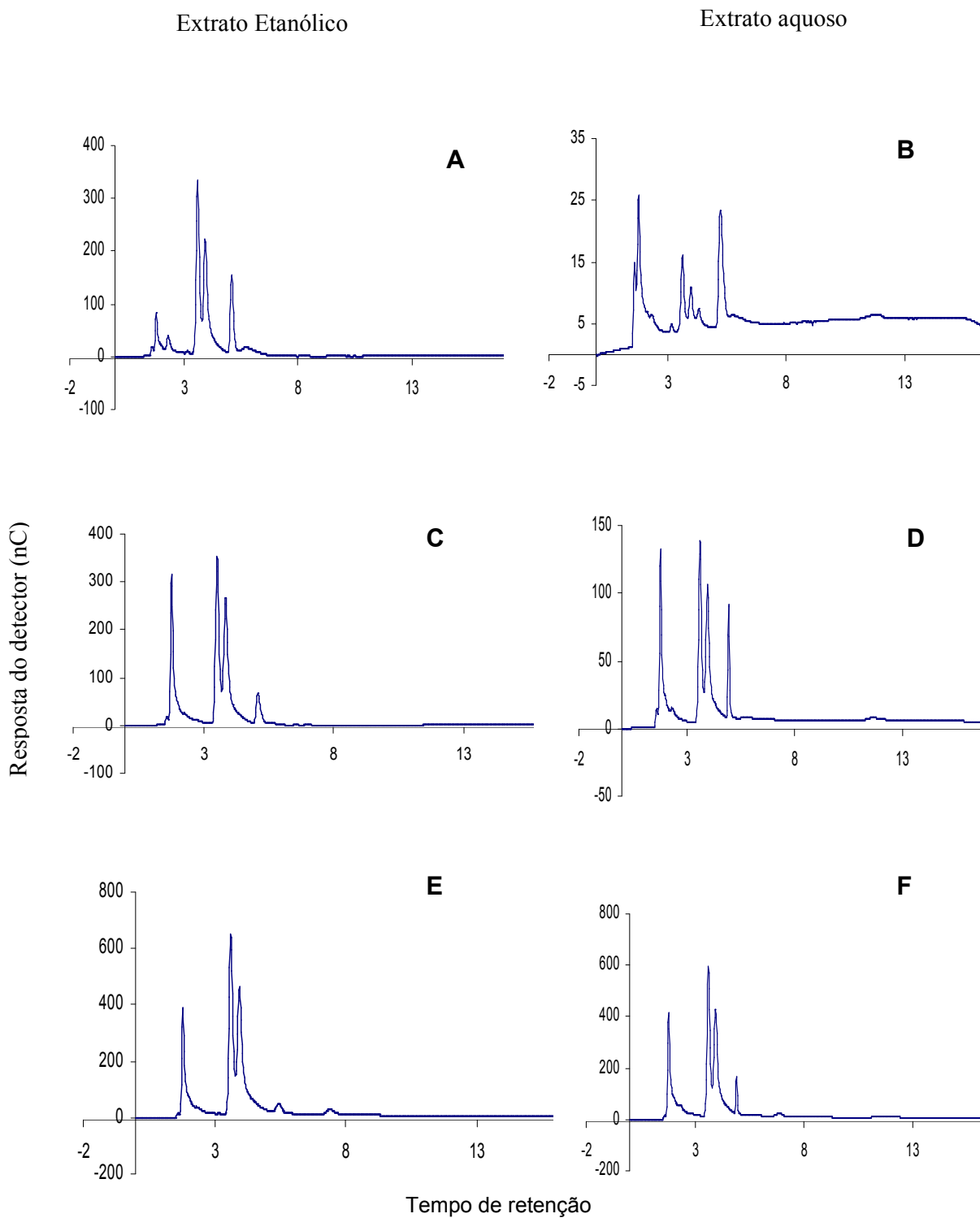
cultivadas a 30 °C. Os valores obtidos para plantas cultivadas sob termoperíodo foram intermediários. As análises de carboidratos indicaram haver maior quantidade de açúcares totais nas plantas cultivadas a 15 °C em relação às cultivadas a 30 °C. Contudo, os maiores valores totais foram encontrados nas plantas cultivadas sob termoperíodo. Os resultados permitiram concluir que as temperaturas baixas limitaram o crescimento de plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* e que os teores de carboidratos foram maiores nessas condições, indicando que esses compostos poderiam estar envolvidos na plasticidade térmica de *A. imperialis* e na crioproteção das plantas em condições de abaixamento de temperatura.

ABSTRACT

Bromeliaceae includes plants with notable plasticity related to the environment (from mesophiles to xerics), especially in regions of a wide range of temperatures. For the beauty they represent, these plants are among the main tropical ornamental species, including the imperial bromélia *Alcantarea imperialis*.

This species is native from the Atlantic Rainforest and grows naturally under rocks or shallow and stony soils in regions with average temperatures of 19 °C, that can vary from 5 to 40 °C in a day. Considering that the growth of plants is reduced under low temperatures and that under these conditions there is an increase in the production of carbohydrates, the aim of this work was to evaluate the growth and changes in non-structural carbohydrates in *A. imperialis* plants growing under different thermal conditions. The culture was established from *in vitro* germinated seeds under solid Murashige & Skoog (1962) medium, with macronutrients reduced to the half (100 mg/L of *myo*-inositol, 30 g/L of sucrose, 7 g/L of agar, pH 5,8), in germination chambers (BOD), with photoperiod of 12 h, under 15 °C, 15/30 °C (dark/light thermoperiod) and 30 °C. A control lot was maintained *in vitro* under 26 °C in culture room and another *ex vitro*, using pinus cork as substrate. The seedlings emergency was weekly evaluated in each treatment and after 3, 6 and 9 months of growth, biometric and non structural carbohydrates were analyzed in the roots, leaves and stem axis, constituted of stem and leaf sheath. The results indicated that 50 days were necessary for emergency of 80% of the seedlings from seeds maintained under 15 °C, while in those grown under 30 °C only 14 days were necessary to obtain the same percentage. The seeds maintained under thermoperiod needed an intermediate period of time to grow, around 21 days. The plants maintained for 9 months under 15 °C presented leaves and roots in reduced number and size and smaller values of fresh and dry masses, being on the average 4 times lower than those grown under 30 °C. The values obtained for plants grown under thermoperiod were intermediate.

The analysis of carbohydrates indicated the existence of higher amounts of total sugars in plants grown under 15 °C in relation to those grown under 30 °C. The highest values of total soluble carbohydrates were found in plants grown under thermoperiodic conditions. The results allowed to conclude that low temperatures limited the growth of *A. imperialis* plants grown *in vitro* and that the carbohydrate levels were higher under these conditions, indicating that these compounds could be involved in the thermal plasticity of *A. imperialis* and in the cryoprotection of plants under low temperatures.



Anexo 1. Análise por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis neutros em raízes de plantas de *A. imperialis* cultivadas *ex vitro* por 9 meses em Sala de Cultura a 26 °C. A= extrato etanólico de raiz; B=extrato aquoso de raiz; C= extrato etanólico da caule; D= extrato aquoso de caule; E= extrato etanólico de folha; F= extrato aquoso de folha.