

DANIELA SOARES DOS SANTOS

**Influência da temperatura, ácido giberélico e cálcio no desenvolvimento de segmentos nodais *in vitro* da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto**

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

SÃO PAULO

2014

DANIELA SOARES DOS SANTOS

**Influência da temperatura, ácido giberélico e cálcio no desenvolvimento de segmentos nodais *in vitro* da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto**

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

ORIENTADORA: DRA. CATARINA CARVALHO NIEVOLA

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

Santos, Daniela Soares dos

S237i Influência da temperatura, ácido giberélico e cálcio no desenvolvimento de segmentos nodais *in vitro* da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto / Daniela Soares dos Santos -- São Paulo, 2013.  
94 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013

Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Baixa temperatura. 3. Regulador de crescimento. I. Título

CDU: 582.564

*"No momento em que nos comprometemos, a providência divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge ao nosso favor. Como resultado da atitude, seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajudas, que nenhum ser humano jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia."*

Goethe

## Agradecimentos

À Dra. Célia Leite Sant'Anna, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação, Dr. Sérgio Romaniuc Neto, Dr. Fábio de Barros, Dra. Edenise Segala e a todos os docentes e alunos, em especial à secretária Márcia Regina Angelo, sempre dispostos a auxiliar em todos os momentos.

A Capes por ter concedido a bolsa de estudo, fundamental para a execução do projeto.

A minha querida orientadora, sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando, compartilhando seus conhecimentos e disseminando sempre atitudes positivas, sou muito grata a tudo que fez por mim durante todos esses anos de convivência.

As minhas amigas queridas de todas as horas, Camila Pereira de Carvalho e Victória de Carvalho, sempre companheiras nas melhores horas e também nas piores, nas conversas casuais sobre temperatura e bromélias, me fizeram acreditar quando achei que não ia conseguir.

À Dra. Vivian Tamaki, sempre buscando melhorias no laboratório da Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica, que viabilizou todo meu trabalho de doutorado.

À Seção de Anatomia do Instituto de Botânica, em especial à Poliana Cardoso, responsável pelos cortes anatômicos, além da amizade e atenção dispensada a mim.

A Dra. Maria Aurineide Rodrigues, pelo auxílio e sugestões sempre oportuna, sempre disposta a contribuir com suas experiências, agradeço pelos ensinamentos.

À Seção de Sementes do Instituto de Botânica, na disponibilização de equipamentos que muito me auxiliaram na execução deste trabalho em especial ao Edmir Vicente Lamarca, sempre presente e amigo.

A Dra. Izulmé Rita Imaculada Santos, por me receber tão bem no laboratório do Cenargem - Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia. Aprendi muito durante o período de estágio.

Aos pesquisadores da Seção de Ornamentais Clóvis, Armando, Francismar, Vanessa, Domingos, pelo convívio animado no Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais. Em especial ao pesquisador Dr. Shoey Kanashiro por toda a atenção e dedicação em relação aos diferentes contratemplos no laboratório, sempre disposto a ajudar e ensinar.

Aos funcionários da Seção de Ornamentais, Ivomar Aparecido Medina amigos e companheiros do dia-a-dia, dividindo sempre, principalmente as coletas. Ao Sr. Geraldo sempre disposto a colaborar.

Aos estagiários da Seção de Ornamentais e também os ex-estagiários pelo convívio e aprendizado constante, principalmente Fernanda de Oliveira de Menezes e David Marum Penna-Firme pelas distrações após o expediente de trabalho. Além de todo suporte de informática que sempre prestou.

As alunas do Núcleo de Pesquisa em Planta Ornamentais, Priscila, Sabrina, Luciana Mollo, Nara, Flávia pela convivência.

À minha grande amiga Cristiane Marinho Guimarães, por sempre me apoiar e me amparar nos momentos mais difíceis, pela paciência, por me alegrar nos momentos de tensão, companheira de todas as horas.

## Conteúdo

Resumo .....	i
Abstract.....	iii
1. Introdução.....	iv
1.1 Alternativa para preservação de bromélias.....	1
1.2 Alongamento caulinar.....	6
1.3 Temperatura e giberelinas .....	8
1.4 Resfriamento e cálcio .....	14
2. Objetivo .....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1 Material Vegetal .....	17
3.2 Obtenção dos segmentos nodais .....	17
3.3 Avaliação da influência da temperatura no crescimento e desenvolvimento de <i>A. strobilacea</i> .....	19
3.4 Avaliação da influência do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>A. strobilacea</i> em diferentes temperaturas .....	19
3.4.1 Ácido giberélico submetido à autoclave .....	19
3.4.2 Ácido giberélico ultrafiltrado .....	21
3.5 Avaliação da influência do cálcio no crescimento de plantas de <i>A. strobilacea</i> mantidas <i>in vitro</i> em diferentes temperaturas.....	23
3.5.1 Meio de Murashige & Skoog (1965) (MS) modificado em relação à concentração de cálcio .....	23
3.5.2 Adição de ionomicina e EGTA no meio nutritivo .....	26
3.6 Parâmetros utilizados para avaliação das plantas de <i>A. strobilacea</i> cultivadas <i>in vitro</i> .....	27
3.6.1 Porcentagem de regeneração.....	27
3.6.2 Análise biométrica.....	28
3.6.3 Determinação de massa.....	29
3.6.4 Taxa de Crescimento Relativo .....	29
3.6.5 Determinação do teor de clorofila e de carotenoides .....	29
3.7 Análise estatística .....	30
4. Resultados e Discussão.....	31
4.1 Avaliação da influência da temperatura no crescimento.....	31
6.2 Avaliação da influência do Ácido Giberélico.....	48
6.2.1 Ácido giberélico submetido a autoclave .....	49
6.2.2 Ácido Giberélico ultrafiltrado .....	57

4.3 Avaliação da influência do cálcio no crescimento de plantas de <i>A. strobilacea</i> mantidas in vitro em diferentes temperaturas.....	65
4.3.1 Meio nutritivo alterado em sua concentração de Cálcio .....	65
4.2 Adição de ionomicina e EGTA no meio nutritivo .....	70
5. Considerações finais e perspectivas .....	80
6. Referências Bibliográficas.....	83

## Resumo

*Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto é uma bromélia ornamental de ampla distribuição, ocorrendo em biomas ameaçados, o que justifica estratégias de conservação para garantir a preservação de germoplasma desta espécie. Uma técnica bastante difundida é a formação de coleção *in vitro* de plantas por crescimento lento, o que possibilita o armazenamento de alta representatividade gênica em espaço reduzido. Plantas dessa espécie cultivadas *in vitro* apresentam alongamento do eixo caulinar possibilitando que os segmentos nodais sejam isolados e utilizados para sua micropropagação. Quando o cultivo destes é mantido a 25 °C, as plantas apresentam crescimento acelerado, havendo necessidade de subcultivos frequentes. Contudo, quando o objetivo é a formação de uma coleção visando a preservação *in vitro*, a redução do crescimento é necessária. O crescimento de espécies de bromélias tem sido reduzido por meio do uso de baixas temperaturas, contudo não foi relatada a influência desse fator sobre o alongamento caulinar dessas espécies tropicais. Nesse sentido, o fato de *A. strobilacea* apresentar o alongamento do caule em condições controladas, torna essa espécie adequada para a avaliação desse processo. O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de utilizar a temperatura baixa para reduzir o crescimento de *A. strobilacea* a fim de criar subsídios para a formação de uma coleção de crescimento lento e aprofundar o conhecimento sobre as causas do alongamento caulinar que essa espécie apresenta quando cultivada *in vitro*. A literatura apresenta relatos isolados sobre a influência da temperatura sobre o alongamento caulinar. Este trabalho propõe avaliar as seguintes questões: A temperatura baixa reduziria o alongamento caulinar? As giberelinas estão envolvidas na promoção do alongamento caulinar? Concentrações de cálcio poderiam interferir no alongamento caulinar? A influência da temperatura sobre o alongamento caulinar depende de giberelinas e cálcio? Os segmentos nodais de *A. strobilacea* foram cultivados *in vitro* e mantidos durante 3 meses, sob temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C. Posteriormente foram realizados dois experimentos com ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). No primeiro, o fitorregulador foi adicionado nas concentrações de 0,5; 1,0; e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura e submetido à esterilização em autoclave; em um segundo momento, 5 e 50 µM de GA<sub>3</sub> e de paclobutrazol foram ultrafiltrados e adicionados ao meio de cultura previamente esterilizado em autoclave. Em um outro lote de plantas, o meio nutritivo foi modificado na sua concentração de cálcio para 0; 0,3; 3,0; 6,0 e 9,0 mM. Também, foi utilizado ionóforo de cálcio (ionomicina) nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 µM e o

quelante deste íon (EGTA) nas concentrações de 1,0 e 10,0 mM. Todos os tratamentos descritos anteriormente foram mantidos por três meses em câmara de germinação ajustadas em temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C. Os resultados mostraram que *A. strobilacea* é uma espécie resistente ao frio, podendo ser mantidas *in vitro* sob temperatura considerada baixa para ambientes tropicais (15 °C). Verificou-se que nessa temperatura baixa ocorre a inibição do alongamento caulinar, diferentemente do observado para espécies de clima temperado, sendo que não foi observado o alongamento mesmo na presença de GA<sub>3</sub>. O restabelecimento do alongamento caulinar foi observado somente a 20 °C com adição de 50 µM de GA<sub>3</sub>, indicando que a faixa térmica influi no processo. Quando cultivadas no meio com modificação de cálcio e com 1,0 e 10,0 mM de EGTA, as plantas apresentaram alongamento caulinar, indicando influência destas substâncias no aspecto alongado da planta. Concluiu-se que a 20 °C pode ter ocorrido uma interação sobre o aumento do alongamento caulinar quando foram aplicadas as menores quantidades de cálcio e as maiores GA<sub>3</sub> filtrado.

## Abstract

*Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto is an ornamental bromeliad of wide distribution, occurring in threatened biomes, which justifies conservation strategies to ensure the preservation of germplasm of this species. A widespread technique is the formation of *in vitro* collection of plants under slow growth, which allows the storage of high genetic variability in reduced space. Plants of this species grown *in vitro* exhibit stem elongation, which enables the isolation of nodal segments for micropropagation. When these are cultured at 25 °C, the plants exhibit rapid growth, requiring frequent subcultures. However, when the goal is the formation of a collection for *in vitro* preservation, growth reduction is required. The growth of bromeliads has been reduced through the use of low temperatures, however, its influence on stem elongation of these tropical species has not been reported. In this sense, the fact that *A. strobilacea* shows stem elongation in controlled conditions makes it suitable for the evaluation of this process. The objective of this work was to verify the possibility of using low temperature to reduce the growth of *A. strobilacea* in order to create subsidies to form a slow growth collection, and increase knowledge of what causes the stem elongation in this species when it is grown *in vitro*. The literature has isolated reports on the influence of temperature over stem elongation. This study questions: would low temperature reduce stem elongation? Are gibberellins involved in promoting stem elongation? Could calcium concentration interfere with stem elongation? Does the influence of temperature on stem elongation depend on gibberellins and calcium? Nodal segments of *A. strobilacea* were cultured and maintained *in vitro* for 3 months at temperatures of 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C and 30 °C. Subsequently, two experiments were performed with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). On the first, concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5 mg l<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> were added to the culture medium, which was then sterilized in autoclave; on the second treatment, 5 and 50 µM of GA<sub>3</sub> and paclobutrazol were ultrafiltered and added to the culture medium previously autoclaved. For another batch of plants, concentration of calcium of the nutrient medium was altered to 0, 0.3, 3.0, 6.0 and 9.0 mM. Calcium ionophore (ionomycin) was also added in the concentrations of 0.1, 1.0 and 10.0 mM with 1.0 and 10.0 mM of calcium chelating agent (EGTA). All treatments described above were kept for three months in growth chambers set at 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C and 30 °C. The results showed that *A. strobilacea* is resistant to cold and can be maintained *in vitro* under temperature considered low for tropical environments (15 °C). It was found that this low temperature inhibits shoot elongation, even

in the presence of GA<sub>3</sub>, different from that observed for temperate species. Stem elongation only resumed at 20 °C with the addition of 50 mM GA<sub>3</sub>, indicating that the temperature influences the process. When grown in medium with altered calcium concentration, 1.0 and 10.0 mM EGTA, the plants showed stem elongation, which indicates the influence of these substances to the elongated appearance of the plant. It was concluded that there was a possible interaction between calcium and GA<sub>3</sub> on stem elongation of *A. strobilacea* plants cultivated at 20 °C.

## 1. Introdução

### 1.1 Alternativa para preservação de bromélias

Bromeliaceae é uma família restrita à região Neotropical (Smith e Downs 1979), com exceção de uma única espécie que ocorre na África Ocidental – a *Pitcairnia feliciana* (Givnish *et al.* 2004), observada em uma região de areia e pedra que confinava o Escudo das Guianas do norte da América do Sul, antes da deriva continental abrir o Oceano Atlântico tropical. Atualmente, estão descritas 58 gêneros e 3248 espécies (Luther 2010). Bromélias são divididas em oito subfamílias (Brochinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae), caracterizadas principalmente pela morfologia das flores, frutos, sementes e dados moleculares (Givnish *et al.* 2007).

As bromélias podem apresentar quatro hábitos de vida diferentes: (i) espécies terrestres, apresentando raízes absorvendo do solo, (ii) algumas espécies terrestres com “tanques” desenvolvidos, formado pela disposição das bainhas foliares em torno do eixo caulinar da planta, onde a água da chuva e matéria orgânica em decomposição podem se acumular e originar húmus, (iii) espécies com tanques altamente desenvolvidos, onde as raízes normalmente funcionam preferencialmente como suporte e (iv) bromélias atmosféricas com ausência total de tanques e que obtêm água e nutrientes exclusivamente via tricomas epidérmicos absorventes. Nesse último caso, qualquer raiz presente tem a função exclusivamente para fixação (Lüttge 2010).

Os tricomas epidérmicos são células modificadas do tecido foliar que possuem a capacidade de reter partículas sólidas da atmosfera bem como gotículas de água e aumentam seu grau de especialização na planta conforme ela vai ocupando lugares com disponibilidade cada vez menor de nutrientes (Benzing 1980). Em relação aos tanques, Smith (1989) atribui a eles a função de contribuir com a manutenção do ecossistema local no qual se encontram, seja floresta úmida e densa, como a Mata Atlântica ou ainda de solos xéricos, típico da caatinga, pois a água acumulada tende a evaporar nos períodos mais quentes do ano, permanecendo, inclusive, disponível para a fauna nas épocas mais críticas de seca.

Membros de Bromeliaceae ocupam ambientes com ampla variação quanto à disponibilidade de água, luz e temperatura. Distribuídas ao longo de toda a zona tropical e subtropical das Américas, ocupam ecossistemas localizados desde o Chile até os Estados

Unidos, tendo a América do Sul como centro de maior diversidade. Elas podem ser encontradas tanto em nível do mar quanto em altitudes de até 4000 metros, além de variados níveis pluviométricos (Benzing 2000).

Devido ao valor comercial que muitas espécies apresentam, têm sido estabelecidos métodos de produção como protocolos de cultivo para suprir a demanda do mercado por espécies para uso alimentício, farmacêutico e paisagístico (Mendes *et al.* 2007; Martins *et al.* 2013; Pérez *et al.* 2013). Estudos sobre a fisiologia de espécies foram realizados, abordando aspectos nutricionais, crescimento, germinação, dentre outros (González *et al.* 2011; Tamaki *et al.* 2007; Pinheiro & Borghetti 2003; Freschi *et al.* 2010; Mollo *et al.* 2011).

O fato de várias espécies possuírem valor como planta ornamental contribui para que muitos representantes da família sejam retirados de seu ambiente natural, ocasionando, inclusive, a extinção de algumas espécies (Anacleto *et al.* 2008; Bencke & Droste 2008; Bonato & Muraro 2008). Diversos estudos foram feitos visando à micropropagação de bromélias de interesse ornamental e também das espécies endêmicas, raras e/ou ameaçadas de extinção (Mercier & Kerbauy 1995, Mercier & Kerbauy 1997, Arrabal *et al.* 2002, Rodrigues *et al.* 2004, Rech-Filho 2005). As vantagens oferecidas por este método de multiplicação de plantas são inúmeras, pois existe a possibilidade de se obter um grande número de plantas em um curto espaço de tempo, com qualidade fitossanitária, o que não ocorre em ambiente natural (Mercier & Kerbauy 1995). Além disso, o cultivo *in vitro* possibilita o armazenamento de alta representatividade gênica em espaço reduzido Engelmann (2011). Os exemplares produzidos poderão ser disponibilizados no mercado de plantas ornamentais, reduzindo, assim, a procura por exemplares retirados ilegalmente da mata, e contribuindo com a preservação da espécie e a conservação de germoplasma. Além disso, as bromélias produzidas podem ser utilizadas em programas de reintrodução em seu ambiente de ocorrência (Toledo-Aceves *et al.* 2008).

*Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto é uma espécie de ampla distribuição pertencente à subfamília Bromelioideae. Pode ser encontrada como saxícola ou epífita, desenvolvendo-se preferencialmente nas bifurcações dos troncos (Reitz 1983). Ela não possui fitotelmata. Floresce durante a estação seca, período em que poucas flores, cuja polinização é realizada pelas aves, estão disponíveis no sudeste do Brasil (Sazima *et al.* 1995). Suas infrutescências formam grandes bagas, com cerca de oito sementes cada uma, que são disseminadas pela avifauna (Figueiredo 2003).

Figueiredo (2003) afirma que a população desta espécie está sendo drasticamente reduzida devido à retirada das árvores que lhes servem de suporte. Outro fator que contribui para a diminuição da espécie são seus atributos ornamentais, como folhas finas e acanaladas, e escapo floral verde, que produz inflorescências avermelhadas em forma de cone (Reitz 1983) (Figura 1).



Figura 1 - *Acanthostachys strobilacea* na natureza (A), detalhe da inflorescência (B), da infrutescência (C) e semente (D).

Exemplares são retirados ilegalmente da mata, diminuindo os indivíduos desta bromélia na natureza. Segundo Lawn (2008), existe um crescimento intenso pela procura de espécies que podem ser cultivadas em cestos suspensos, dentre elas *A. strobilacea*, provavelmente devido à presença de folhas que chegam a atingir até 2 metros de comprimento. Esta espécie é listada por Lorenzo-Cáceres (2004) como planta ornamental utilizada na Espanha, o que

indica o potencial de exportação de *A. strobilacea*. Apesar de suas características atrativas e de alguns exemplares terem sido encontrados à venda, não existiam relatos sobre a produção dessa espécie voltada a atender ao mercado de plantas ornamentais até o estabelecimento do cultivo *in vitro* dessa bromélia realizado por Santos *et al.* (2010).

No protocolo de cultivo estabelecido por Santos *et al.* (2010), é possível produzir cerca de 80 mudas de *A. strobilacea* a partir de uma única semente, em um período de um ano, atingindo, inclusive a fase de florescimento por meio do cultivo *in vitro* de segmentos nodais. Esse protocolo foi possível devido ao alongamento do eixo caulinar exibido pela espécie durante seu cultivo *in vitro*. Por meio desse protocolo, o crescimento dessa bromélia é potencializado em relação ao que ocorre na natureza, sendo adequado à produção de plantas para atender ao mercado de ornamentais. Contudo, devido a esse crescimento acelerado, há a necessidade de vários subcultivos, elevando os custos de manutenção das culturas quando se visa manter uma coleção *in vitro* para conservação de germoplasma. Portanto, métodos para desacelerar o crescimento são indicados nesse caso. Dentre as técnicas utilizadas, está a redução do crescimento por baixa temperatura.

A faixa de temperatura considerada baixa para ambientes tropicais é considerada entre 10 e 15° C (Engelmann 2011). A iniciativa de utilizar a baixa temperatura para a conservação de bromélias *in vitro* está baseada nos dados sobre os ambientes ocupados por essas espécies, pois podem ser encontradas em ambientes cujas condições de temperatura podem ser consideradas estressantes, tais como estabelecimento sobre rochas ou como epífitas no dossel de árvores. Além disso, espécies de Bromeliaceae podem ser encontradas colonizando áreas tanto em nível do mar quanto em altitudes que podem atingir até 4 mil metros (Benzing 2000). Essa grande diversidade de ambientes indica ser uma família plástica em relação à temperatura ambiente e, por isso, diferentes estratégias metabólicas têm sido observadas em muitas espécies de bromélias, de modo a garantir a sobrevivência nesses ambientes (Mollo *et al.* 2011), muitas vezes estando associados à redução do crescimento (Pedroso *et al.* 2010) e alterações na morfologia (Amoo *et al.* 2009).

*Acanthostachys strobilacea* possui ampla distribuição (Silva & Gomes 2003), podendo ocorrer nos domínios de Cerrado e Mata Atlântica, sendo encontrada em formações de floresta ombrófila densa aberta, floresta estacional semidecidual e floresta estacional decidual (Stehmann *et al.* 2009). Tem sido descrita nos estados de Maranhão, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (Silva & Gomes 2003). A temperatura média anual

no domínio do Cerrado, local de onde as sementes utilizadas neste trabalho foram coletadas, fica em torno de 22 a 23 °C, sendo que as médias mensais apresentam grande variação. As máximas absolutas mensais não variam muito ao longo dos meses do ano, podendo chegar a mais de 40 °C e as mínimas absolutas mensais variam bastante, atingindo valores próximos ou até abaixo de zero, nos meses de maio, junho e julho (Klein 2000). Devido à diversidade de ambiente e de latitude de ocorrência, *A. strobilacea* está sujeita à grande diversidade de temperatura, mostrando a adaptação às variações térmicas, o que indica possibilidade de manutenção *in vitro* sob temperaturas inferiores a 25 °C.

O cultivo *in vitro* sob crescimento lento por baixa temperatura tem sido utilizada com sucesso para outras espécies de bromélias como: *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.* 2010), *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.* 2011) e *Nidularium minutum* (Carvalho *et al.* 2013). Inicialmente, este trabalho apresenta um estudo sobre a viabilidade de utilização da baixa temperatura para reduzir o crescimento de *A. strobilacea* cultivada *in vitro*, a partir do protocolo previamente estabelecido no Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo por Santos *et al.* 2010. A avaliação desse método de conservação para a espécie está prevista como um subprojeto do Projeto intitulado “Estudos integrados visando ao conhecimento interdisciplinar nas famílias Bromeliaceae e Xyridaceae.” vinculado ao Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB). Posteriormente, será apresentado neste estudo um aprofundamento sobre a influência da temperatura sobre a fisiologia da espécie, notadamente sobre o alongamento caulinar que essa bromélia apresenta quando cultivada *in vitro*.

A verificação do alongamento do eixo caulinar em plantas de *A. strobilacea* favoreceu o isolamento dos nós de modo a fornecer explantes para a produção *in vitro* dessas plantas em larga escala com uniformidade morfológica, haja vista os nós conterem as gemas axilares, estruturalmente idênticas ao ápice caulinar, sendo caules em miniatura com um meristema apical dormente e várias folhas jovens (Sajo & Castro 2012). A obtenção de plantas por meio dessa técnica é importante no comércio de plantas ornamentais, por permitir a obtenção de clones. Além desse aspecto, para estudos de fisiologia básica, o uso de clones tem sido considerado aconselhável, pois a variabilidade genética é reduzida, diminuindo interferências na avaliação final dos resultados. Segundo Burr & Tinus (1996), a reprodutibilidade dos experimentos em fisiologia vegetal é limitada pelo grande número de indivíduos necessários para se reduzir os erros experimentais causados pela grande variabilidade, aumentando a

confiabilidade dos experimentos. O fato de Santos *et al.* (2010) verificarem que a produção de clones de *Acanthostachys strobilacea* quando cultivada *in vitro* na presença de luz, pode apresentar crescimento em roseta ou alongar seu eixo caulinar dependendo das condições de cultivo, fator que torna essa bromélia um modelo de estudo para estudos fisiológicos.

Este trabalho visa, portanto, avaliar a influência do GA<sub>3</sub> e do cálcio no processo de alongamento caulinar e resistência ao frio em plantas de *A strobilacea*, mantidas em diferentes temperaturas. A seguir, serão apresentadas as justificativas para essa abordagem.

### *1.2 Alongamento caulinar*

Nas espécies que formam uma roseta compacta, como em Bromeliaceae, o alongamento do entrenó é quase inteiramente inibido durante o desenvolvimento normal (Tsukaya 2005). Contudo, em certas condições de cultivo, como na ausência de luz (estiolamento), o alongamento do caule pode ocorrer, evidenciando os segmentos nodais com distanciamento dos entrenós, conforme obtido nas bromélias *Ananas comosus* (Tamaki *et al.* 2007) e *Orthophytum mucugense* (Lima *et al.* 2012). Entretanto, algumas plantas apresentam alongamento do eixo caulinar na presença de luz (Vince-Prue 1977; Smalle *et al.* 1997).

Uma planta segue um padrão bem definido de desenvolvimento que lhe confere uma estrutura característica (Apezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2006). A parte aérea das plantas superiores apresenta a mesma organização básica caulinar, onde se observam uma ou mais folhas, os nós em que estão inseridas as folhas, os entrenós (região logo abaixo do nó), e ainda uma ou mais gemas laterais que se localizam exatamente acima do ponto de inserção de cada folha, nas axilas foliares, conforme demonstrado na figura 2 (Taiz & Zeiger 2013).

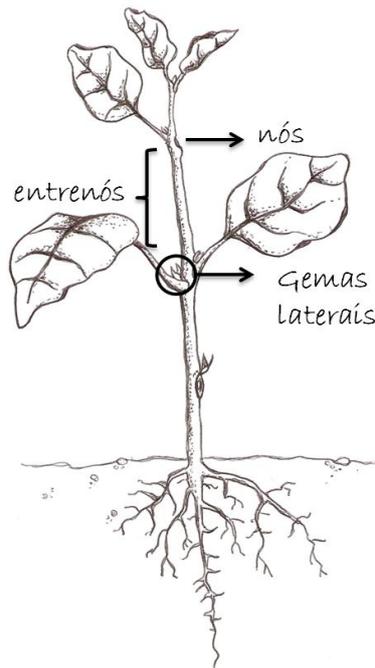


Figura 2 – Representação geral de uma planta superior não específica mostrando o nó, o entrenó e as gemas laterais (Desenho cedido por Cristiane Marinho Guimarães).

A organização do caule é chamada de fitômero, sendo que o meristema apical da planta pode formar repetidamente tantos fitômeros quanto às condições ambientais forem favoráveis. As gemas axilares consistem de um meristema axilar, um caule pequeno e folhas imaturas, podendo desenvolver ramificações da planta ou dar origem a novos brotos (Taiz & Zeiger 2013). O meristema apical do caule, quando em crescimento ativo, origina os primórdios foliares de forma rápida e sucessiva, não permitindo a distinção, na fase inicial, dos nós e entrenós. À medida que o crescimento prossegue, ocorre o alongamento dos entrenós, possibilitando a distinção das regiões nodais onde estão inseridas as folhas (Sajo & Castro 2006). Em plantas monocotiledôneas, algumas células meristemáticas permanecem inseridas em tecidos maduros e formam meristemas intercalares que geram células envolvidas no crescimento e alongamento dos entrenós (Evert 2006). A planta pode modificar sua morfologia de acordo com as mudanças nas condições ambientais, através de alongamento celular, cujas células são fornecidas pela divisão celular. Conforme Obroucheva (2008), o crescimento em expansão da célula determina um rápido alongamento de vários órgãos e estabelece o padrão morfogênico da própria planta.

O alongamento caulinar de uma planta ocorre em resposta a uma ação coordenada entre a divisão e a expansão celular (Evert 2006), sendo que a redução do alongamento caulinar pode ser acompanhada tanto por uma inibição da expansão quanto da divisão da

célula (Sachs 1965). No caso de plantas de roseta e caulescentes, o alongamento ocorre uma função da atividade do meristema subapical que podem ser regulado pela giberelina que ocorre naturalmente. A transição do hábito roseta para o crescimento caulescente, ou o inverso, é causada por alterações na atividade meristemática subapical. Plantas com entrenós curtos contêm menor quantidade de células quando comparadas com plantas de entrenós longos. Sugere-se que a duração ou a taxa de atividade da divisão celular na região pode variar consideravelmente durante o ciclo de vida de uma planta e que fatores ambientais podem modificar o comprimento do caule, através dos seus efeitos sobre a multiplicação celular na região subapical (Sachs 1965).

No caso de planta que apresentam crescimento em roseta, os conhecimentos sobre o alongamento caulinar são provenientes de estudos referentes à transição da fase vegetativa para a reprodutiva de *Arabidopsis thaliana* (Obroucheva 2008; Matschi *et al.* 2013). Diversos trabalhos têm demonstrado uma forte influência da temperatura ambiental na indução do alongamento caulinar em plantas (Berghage & Heins 1991; Emery *et al.* 2001; Fukuda *et al.* 2009; Kurepin *et al.* 2010). Entretanto, não foram encontrados trabalhos sobre o efeito da temperatura sobre o alongamento caulinar de bromélias.

### 1.3 Temperatura e giberelinas

Giberelinas (GA) formam uma grande família de compostos diterpenóides, alguns dos quais são reguladores de crescimento bioativos, que controlam diversos processos de desenvolvimento como germinação de sementes, expansão foliar, desenvolvimento de tricomas, flores, frutos e alongamento caule (Davies 1995). Há diversas evidências de que os estímulos ambientais, incluindo luz e temperatura, podem afetar estes aspectos do desenvolvimento da planta, por alterar as concentrações de giberelina e/ ou alterar a capacidade da planta em responder ao fitorregulador (Olszewski *et al.* 2002).

A biossíntese de giberelina nas plantas superiores pode ser dividida em três fases. Primeiro, ocorre síntese de *ent*-caurenos nos proplastídeos. Em seguida, no retículo endoplasmático, *ent*-caurenos é oxidado para GA<sub>12</sub>-aldeído, precursor geral das giberelinas, através monooxigenases do citocromo P450 microsomal, e, por fim, no citosol, ocorre a conversão de GA<sub>12</sub>-aldeído em diversas giberelina. Na primeira etapa, difosfato geranyl geranyl, precursor comum para diterpenos (por exemplo, GA e da cadeia fitol da clorofila) e tetraterpenos (carotenoides), é sintetizada por uma via mevalonato-dependente ou

independente. Posteriormente, o difosfato de geranyl geranyl, é convertido *ent*-caureno em uma reação de ciclização em duas etapas e catalisados pelo *ent*-copalyl difosfato sintase (CPS) e *ent*-caureno sintase (KS), com *ent*-copalyl difosfato como intermediário. (Olszewski *et al.* 2002; Taiz & Zeiger 2013).

As giberelinas são definidas por sua estrutura química. Ocorrem naturalmente como ácidos tetracíclicos diterpenóides com estrutura baseados no esqueleto carbônico *ent*-gibberellane. Este grupo de hormônios vegetais é conhecido por ser regulador de muitas fases do desenvolvimento de plantas (Yamaguchi 2008). Ácido giberélico causa, entre outros efeitos, um hiperalongamento de caule tanto por meio do estímulo da divisão celular quanto o alongamento da célula. Apenas algumas das 136 giberelinas conhecidas possuem uma atividade biológica intrínseca. Não surpreendentemente, muitas das primeiras giberelinas identificadas são as que possuem alta atividade biológica, como as GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub> e GA<sub>7</sub>, a giberelina bioativa presente em uma determinada espécie é acompanhada por uma dúzia ou mais giberelinas que são, provavelmente, precursores inativos ou produtos desativados das formas ativas (Taiz & Zeiger 2013). Giberelina A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>), também conhecida por ácido giberélico, tem sido identificada em 45 plantas. O maior acúmulo de ácido giberélico é encontrado no fungo *Gibberella fujikuroi* do qual é produzido, comercialmente, o ácido giberélico, usado para promover germinação de sementes, alongamento caulinar, e crescimento de fruto em uma variedade de plantas de interesse agrônômico e comercial (Stuart & Cathey 1961). Com a identificação de muitos genes envolvidos na biossíntese e catabolismo da giberelina, consideráveis avanços estão sendo feitos em nosso entendimento do tecido/ célula específica e sua regulação por fatores ambientais (Hedden & Phillips 2000), como a temperatura.

A aplicação de giberelina promove o alongamento dos entrenós em várias espécies, sendo o estímulo mais pronunciado nas plantas anãs ou em roseta, o Ga<sub>3</sub> exógeno provoca um excesso de alongamento do caule em plantas anãs de modo que as plantas assemelham-se as variedades mais altas da mesma espécie (Taiz & Zaiger 2013). Algumas plantas assumem a forma de roseta em dias curtos e apresentam alongamento da parte aérea em dias longos. Giberelina causam *bolting* (alongamento prematuro do caule de uma planta em roseta, geralmente associado ao florescimento), em plantas mantidas sob condições de dias curtos, o *bolting* normal é regulado pela giberelina endógena (García-Martínez & Gil 2001).

Plantas em roseta apresentam uma exigência de frio para o alongamento do caule, podendo essa exigência ser superada pela aplicação de giberelina. O alvo das giberelinas é o meristema intercalar, situado à base do entrenó, que produz derivadas para cima e para baixo (Sachs 1965). Em algumas plantas cultivadas, a redução da altura é desejável, o que pode ser obtido pelo uso de inibidores da síntese de giberelinas, em cultivo de flores, por exemplo, a restrição do alongamento pode ser obtida pela aplicação de inibidores da síntese de giberelina como o paclobutrazol (De Siqueira & Salomão 2002).

A giberelina endógena regula seu próprio metabolismo, ao desviar ou inibir a transcrição de genes que codificam as enzimas para as vias de biossíntese e degradação de giberelinas. Sendo assim, o nível de giberelinas ativas é mantido com pouca variação, contanto que os precursores estejam disponíveis e as enzimas da biossíntese e da degradação da giberelina sejam funcionais, condições ambientais podem alterar a transcrição dos genes da biossíntese de giberelina (Yamaguchi & Kamiya 2000). As temperaturas baixas são necessárias para a germinação de algumas sementes e para o florescimento em certas espécies (vernalização). Um tratamento prolongado de frio é necessário para o alongamento do caule e para o florescimento de *Thlaspi arvense* e a giberelina pode substituir o tratamento por frio (Metzger 1985). Ou seja, em geral, as giberelinas induzem o alongamento caulinar, ocasionando o mesmo efeito que o tratamento com frio ocasionaria. Na ausência do tratamento por frio, o ácido *ent*-caurenóico é acumulado em grandes quantidades nos ápices caulinares, local onde também ocorre a percepção do estímulo do frio. Após esse tratamento e o retorno para altas temperaturas, o ácido *ent*-caurenóico é convertido em GA<sub>9</sub>, a giberelina mais ativa no estímulo de respostas de florescimento. Tais resultados são consistentes com um aumento, induzido pelo frio, da atividade da enzima ácido *ent*-caurenóico-hidrolase nos ápices caulinares (Taiz & Zaiger 2013).

As giberelinas aumentam tanto o alongamento quanto a divisão celular, conforme evidenciado pelos aumentos do comprimento celular e do número de células, em resposta à aplicação deste fitorregulador (Paleg 1965). A taxa de alongamento pode ser influenciada tanto pela extensibilidade da parede celular quanto pela taxa de absorção de água controlada osmoticamente. A giberelina não apresenta efeito nos parâmetros osmóticos, mas tem sido consistentemente observado que causa um aumento tanto na extensibilidade mecânica da parede celular quanto no relaxamento por estresse das paredes das células vivas (Farrell *et al.*

2006). As giberelinas regulam a transcrição das quinases do ciclo celular nos meristemas intercalares (Taiz & Zaiger 2013).

Giberelinas são essenciais para alongamento de hipocótilos em respostas a alta temperatura (Stavang *et al.* 2009), e temperatura baixa inibe a expressão de genes relacionados à biossíntese de giberelina e induz genes do catabolismo deste fitorregulador, reduzindo assim o acúmulo de GA e, conseqüentemente, limitando o crescimento das plantas (Hua 2009).

Como organismos sésseis, as plantas, ao longo de sua evolução, desenvolveram grande plasticidade para se adaptar ao seu ambiente circundante. A temperatura age como sinalizadora de múltiplos processos de desenvolvimento e tem efeitos dramáticos sobre arquitetura das plantas, assim como na sua biomassa, envolvendo uma integração complexa de redes de sinalização múltiplas hormonais (Patel *et al.* 2009). As plantas podem responder a uma variedade de sinais bióticos e abióticos, que afetam seu crescimento e desenvolvimento. De acordo com as condições de crescimento natural, as plantas podem estar sujeitas a várias condições de estresse, dentre elas a temperaturas altas ou baixas, que têm efeitos profundos sobre seu crescimento e desenvolvimento (Hahn & Walbot 1989). Patel *et al.* (2009) afirmam que, quando a planta é cultivada em baixas temperaturas, a redução no tamanho é acompanhada pela expressão de genes envolvidos na aclimação ao frio. Plantas constitutivamente que expressam esses genes apresentam tanto tolerância ao resfriamento quanto redução severa no crescimento. Essa redução no crescimento tem sido associada à expressão de proteínas repressoras do crescimento por meio da redução de níveis de giberelina, apontando para a relação entre essa substância e a temperatura no controle do crescimento da planta (Ueguchi-Tanaka *et al.* 2007).

As mudanças de temperatura, tanto alta como baixa, são percebidas e então traduzidas para o núcleo onde o transcriptoma é alterado. A temperatura é um parâmetro físico que influencia estruturas moleculares (proteína, DNA) ou supramoleculares (membranas, cromossomas), através de efeitos termodinâmicos simples ou, ainda, alterando a conformação da proteína, devido à existência de um contínuo membrana/ citoesqueleto, alterações no estado físico da membrana pode gerar uma desestabilização do citoesqueleto, contudo esses eventos podem ocorrer de forma interdependentes (Ruelland & Zachowski 2010). A diminuição na temperatura causa redução das atividades enzimáticas, enrijecimento das membranas, desestabilização de complexos de proteínas, desestabilização da estrutura

secundária de RNA, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, diminuição da fotossíntese e extravazamento de solutos através das membranas. Como consequência, a alteração da temperatura, tanto a redução quanto o aumento em relação ao ótimo da espécie, pode ter um impacto prejudicial tanto nos tecidos vegetativos como nos reprodutivos (Ruelland *et al.* 2009). Alteração na temperatura induz o aumento de certos metabólitos intermediários e a diminuição de outros. Os sensores de frio das células vegetais incluem mudanças induzidas pela na fluidez da membrana, alteração da conformação de proteínas e ácidos nucleicos e / ou concentração de metabólitos (um metabólito específico ou estado redox) (Chinnusamy *et al.* 2007). Em suma, as células vegetais têm uma rede integrada de sensores de temperatura que desencadeiam respostas de adaptação de curto e longo prazo frente às constantes mudanças nas condições térmicas ambientais resultando em um novo equilíbrio celular (Janská *et al.* 2010).

A adaptação da planta às mudanças na temperatura ambiental deve ser, além de eficiente, rápida, de modo a garantir sua sobrevivência, pois são seres sésseis (Browse & Xin 2001). As plantas, quando expostas ao frio, tem a velocidade das reações químicas dos diferentes processos metabólicos reduzida, diminuindo a quantidade de energia disponível e restringindo a absorção de água e de nutrientes. Consequentemente, ocorre a diminuição da síntese de molécula orgânica com consequências no crescimento (Larcher 2006). De acordo com Georgieva & Lichtenthaler (2006), alterações de temperatura podem afetar o tamanho, e a forma das células fotossintéticas, quantidade de pigmentos e consequentemente a fotossíntese. Temperaturas baixas tendem a reduzir a fluidez da membrana, para evitar esse efeito, os fosfolípidos de membrana apresentam alta porcentagem de ácidos graxos insaturados que mesmo em condições de estresse por frio mantém as propriedades de membrana estáveis (Taiz & Zeiger 2013). Jusaitis *et al.* (1981) observaram que segmentos nodais isolados de *Avena sativa* cultivadas em 10, 20 ou 30 °C variam em seu conteúdo de fosfolípido dependendo da temperatura, em 10 °C foi observado maior proporção de ácido graxos insaturados.

A temperatura influencia na taxa de divisão celular. Células de folhas de cevada mantidas em 5 °C são menores quando comparadas com as células das folhas da mesma espécie mantidas em 20 °C. Além disso, na base da folha, onde a atividade mitótica é maior, o crescimento a 5 °C provoca uma redução no tempo de duplicação das células, reduzindo o crescimento em extensão da planta em resposta ao frio; sob estas circunstâncias, as plantas

são capazes de gerar uma reserva de células divididas, mas não expandidas, neste caso, sob temperatura baixa, plantas de cevada são capazes de desviar os recursos do crescimento em extensão para divisão celular, e acumular células divididas, de modo que haja uma expansão posteriormente no momento em que ocorrer um reaquecimento (Harrison *et al.* 1998).

Várias descobertas apontam para um modelo em que eventos de sinalização local e de longa distância controlam a expressão de genes que codificam fatores de transcrição, os quais, por sua vez, determinam o caráter ou atividade de um determinado tecido ou célula, frequentemente, tais mecanismos envolvem circuitos de feedback onde dois ou mais genes interagem, fazendo com que um regule a expressão do outro (Taiz & Zeiger 2013). Um exemplo é o efeito da temperatura baixa no metabolismo da giberelina. Quando a planta é exposta a uma temperatura sub-ótima, o metabolismo de giberelina é alterado via síntese de transcritos de genes GA2ox, como o gene PsGA2ox2, expresso no entrenó expandido de ervilha e está envolvido na mediação das respostas termoperiódicas do alongamento caulinar e inativação do GA<sub>1</sub> (Stavang 2007). Um aumento nos níveis das enzimas de GA2ox resulta em uma redução na giberelina bioativa, causando, assim, um maior acúmulo de proteínas repressoras do crescimento DELLA. Estudos demonstram, ainda, que fatores de transcrição CBF1 regulam especificamente a expressão do gene RGL3 o que também resulta no acúmulo dessas DELLA. Este acúmulo de DELLA induzido por CBF1 pode, inclusive, contribuir de uma forma sinérgica com a via COR, responsável por promover a adaptação da planta ao frio (Achard *et al.* 2008).

Os estudos sobre o efeito da temperatura no crescimento e desenvolvimento de plantas centralizam-se, principalmente, para espécies de clima temperado, sendo bem estabelecidas condições térmicas ótimas para o crescimento, geralmente variando entre espécies e, às vezes, até mesmo entre os genótipos. Entretanto, para espécies tropicais, a avaliação dos efeitos da temperatura baixa é pouco relatada, a despeito da adaptação que muitas destas plantas apresentam em relação às variações térmicas existentes nos trópicos. O estudo sobre os efeitos da temperatura sobre a fisiologia dessas espécies podem revelar novos mecanismos de adaptação, desativados no ambiente natural. A interação desse fator ambiental à presença de giberelinas não tem sido encontrada. São perguntas deste trabalho: a temperatura baixa também induziria o alongamento caulinar para espécies tropicais à semelhança do que observado para espécies de clima temperado? Tendo em vista que, em geral, as giberelinas induzem o alongamento caulinar, ocasionando o mesmo efeito que o tratamento de frio, a

presença de GA alteraria o padrão de alongamento, dependendo da temperatura de cultivo? Haveria interação entre GA, temperatura e alongamento em plantas de *A strobilacea*?

#### 1.4 Resfriamento e cálcio

A temperatura pode ser o principal fator determinante na distribuição latitudinal de plantas. Muitas plantas, independente da origem, podem realizar fotossíntese e crescer em temperaturas que variam entre 10 – 35 °C. Baixa temperatura é uma expressão relativa, plantas de origem tropical e subtropical ficam sujeitas a danos na fotossíntese e desenvolvimento normalmente em temperaturas abaixo de 10 °C. Entretanto, plantas de clima frio podem realizar fotossíntese e desenvolver normalmente em temperatura em cerca de 0 °C (Öquist 1983, Rao 2004). Em espécies de regiões temperadas, a baixa temperatura de cultivo varia de 4 – 10 °C e são adequadas para diminuir o crescimento (Orlikowska 1992), contudo, para algumas espécies essa faixa de temperatura pode ser prejudicial, causando estresse por frio (Benson 2008), como ocorre com espécies tropicais. Assim, nesse caso, as temperaturas consideradas baixas e utilizadas para reduzir o crescimento variam de 15 – 18 °C (Banerjee & Langhe 1985).

A presença do cálcio tem sido relacionada à capacidade de plantas resistirem ao frio (Jeon & Kim 2013). Aspectos relacionados à redução do crescimento *in vitro* em baixa temperatura de plantas de *Solanum tuberosum* apontam para a influência positiva do uso do cálcio no meio de cultivo, tendo em vista que este íon melhora a qualidade das plantas micropropagadas, reduzindo anormalidades fenotípicas como vitrificação, hiperhidricidade, estiolamento de parte aérea e diminuição da senescência foliar, observadas frequentemente durante a manutenção de culturas *in vitro* à baixa temperatura (Sarkar *et al.* 2005).

O cálcio age como um mensageiro intracelular no acoplamento de uma vasta gama de sinais extracelulares para desencadeamento de processos específicos como fluxo citoplasmático, tigmotropismo, gravitropismo, divisão, alongamento e diferenciação celular, fotomorfogênese, defesa e resposta ao estresse (Reddy 2001).

Os processos inumeráveis em que este íon participa são grandes e crescentes, e envolve quase todos os aspectos do desenvolvimento da planta. A concentração de cálcio no citoplasma da célula é mantido baixo, varia entre 100-200 nM, contudo, a concentração de cálcio na parede celular e nas organelas são na ordem de milimolar (Reddy 2001). Cálcio, geralmente, não é limitante em condições de campo. Ainda existem vários defeitos que

podem ser associados com baixos níveis deste íon, incluindo a inibição do desenvolvimento da raiz, necrose da folha, podridão da flor, alteração nos frutos, dentre outros. As causas para estes efeitos não são totalmente claras. No entanto, duas áreas dentro da célula foram reconhecidas como sendo alvos importantes. Primeiro é a parede celular, onde o cálcio desempenha um papel fundamental na ligação cruzada de resíduos de pectina ácidas. A segunda é o sistema de membrana celular, em que a baixa concentração de cálcio aumenta a permeabilidade da membrana plasmática. Durante a formação da parede da célula, os resíduos de ácidos (por exemplo, pectina, ácido galacturônico) são segregados na forma de ésteres metílicos, e só depois desesterificado por pectina metilesterase, libertando grupos carboxílicos, os quais se ligam ao cálcio. Assim, considerou-se que a baixa concentração de cálcio deve tornar a parede celular mais flexível, facilitando o alongamento celular, enquanto altas concentrações devem enrijecer a parede e torná-la menos plástica (Wyn Jones & Lunt 1967; Burström 1968), dificultando o alongamento.

Quando as plantas são expostas à baixa temperatura, ocorre uma alteração na fluidez da membrana, gerando um influxo de cálcio para o citosol, seguido por uma resposta secundária na quais proteínas cinases reguladas pelo frio e cálcio estão envolvidas (Monroy *et al.* 1998). Alguns trabalhos propõem que este mineral age como mensageiro secundário na aclimatação de plantas ao frio (Knight *et al.* 1996; Monroy *et al.* 1998; Martin & Busconi 2001). Monroy & Dhindsa (1995) relataram que o influxo de cálcio aumentou quando plantas de *Medicago sativa* foram transferidas de 25 °C para 15 °C, apontando para a existência de uma sinalização pelo frio mediada por cálcio, induzindo a expressão do gene *cas* (cold acclimation-specific) e aclimatação ao frio, sugerindo que o influxo de cálcio desempenha um papel essencial na aclimatação ao frio por esta planta.

Este trabalho visa avaliar se existe participação do cálcio na tolerância ao frio em plantas de *A. strobilacea*. Adicionalmente, foi ampliada a avaliação sobre a influência desse íon sobre a morfologia em plantas dessa bromélia mantidas sob a temperatura de 30° C.

A investigação sobre o papel do cálcio no desenvolvimento das plantas mostram sua influência em nível de expressão gênica, como relatado por Abbasi *et al.* 2004, que verificaram que a expressão do gene OsCDPK13 (um membro da família proteína cinase dependente de cálcio) e o acúmulo de proteínas foram estimulados em resposta ao tratamento com GA<sub>3</sub> em bainhas foliares de arroz. Interação entre cálcio e giberelinas também foi mostrada por Gilroy & Jones (1992), que verificaram que alterações na concentração interna

de cálcio podem atuar mediando os efeitos do ácido giberélico e ácido abscísico na síntese de  $\alpha$  – amilase em células de aleuroma.

Por fim, considerando-se que giberelinas, temperatura e cálcio são relatados na literatura como indutores e/ou repressores do alongamento caulinar, este trabalho visou, também, explorar a relação entre esses componentes sobre a ocorrência do alongamento caulinar nas plantas de *A. strobilacea*, abordagem fisiológica inédita em bromélias.

Formularam-se previamente as seguintes hipóteses:

- a) A temperatura de cultivo pode modular o crescimento e o padrão de alongamento de plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*.
- b) O ácido giberélico poderia potencializar o alongamento do eixo caulinar nas plantas mantidas nas diferentes temperaturas de cultivo *in vitro*.
- c) A alteração da disponibilidade de cálcio para a planta pode atribuir uma resistência da planta ao frio.

## 2. Objetivo

O presente estudo teve como objetivos:

- a) Verificar a possibilidade de utilização de temperaturas baixas (10° C e 15° C) para reduzir o crescimento de plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*, visando à redução dos subcultivos e manutenção de coleção *in vitro* sob crescimento lento;
- b) Verificar a influência da temperatura sobre o alongamento caulinar de plantas de *A. strobilacea*;
- c) Verificar o papel do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) sobre o alongamento de plantas de *A. strobilacea*, mantidas em diferentes temperaturas de cultivo (10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C).

d) Avaliar a influência do cálcio na tolerância dessa planta ao resfriamento e o seu papel no alongamento do eixo caulinar de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado nos experimentais foram segmentos nodais obtidos de plantas alongadas *in vitro*, a partir de sementes de *Acanthostachys strobilacea*, coletadas de plantas matrizes localizadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP (22°15' 04.2" S e 47°09'56.8" W) (figuras 2A e 2B) e armazenadas a 10 °C, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Pesquisa em Planta Ornamentais (NPPO), do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

#### 3.2 Obtenção dos segmentos nodais

Sementes de *A. strobilacea* foram submetidas à desinfestação superficial de acordo com o protocolo a seguir: as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial (2 % de cloro ativo) acrescido de 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup>, mantidas sob agitação por 20 minutos e transferidas para uma solução aquosa de HCl (ácido clorídrico) a 25 % por 10 minutos. Após enxágue com água destilada, as sementes foram colocadas em etanol 70 % por 5 minutos e em seguida em fungicida (Benomyl 0,1 %) por mais 15 minutos e posteriormente em hipoclorito de sódio comercial com 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup> por 1 hora sob agitação. Após esse período, foram distribuídas em frascos fechados de 250 ml contendo 40 mL de meio nutritivo formulado por Murashige e Skoog (1962) na concentração de macronutrientes diluídos a um quinto em relação à formulação original (MS/5), acrescido de sacarose a 2 %, 100 mg.L<sup>-1</sup> de myo-inositol e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi geleificado com ágar (5 g.L<sup>-1</sup>) e submetido à esterilização em autoclave por 15 minutos a 121 °C. As sementes depositadas nos frascos foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 14 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (condição indutora de alongamento do eixo caulinar) fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram<sup>®</sup> super luz do dia 40 W), e cultivadas nestas condições durante 2 meses (figura 3C). Após a germinação das sementes e alongamento do caule, os segmentos nodais foram isolados em

câmaras de fluxo laminar (figura 3D) e utilizados para iniciar os experimentos descritos a seguir.

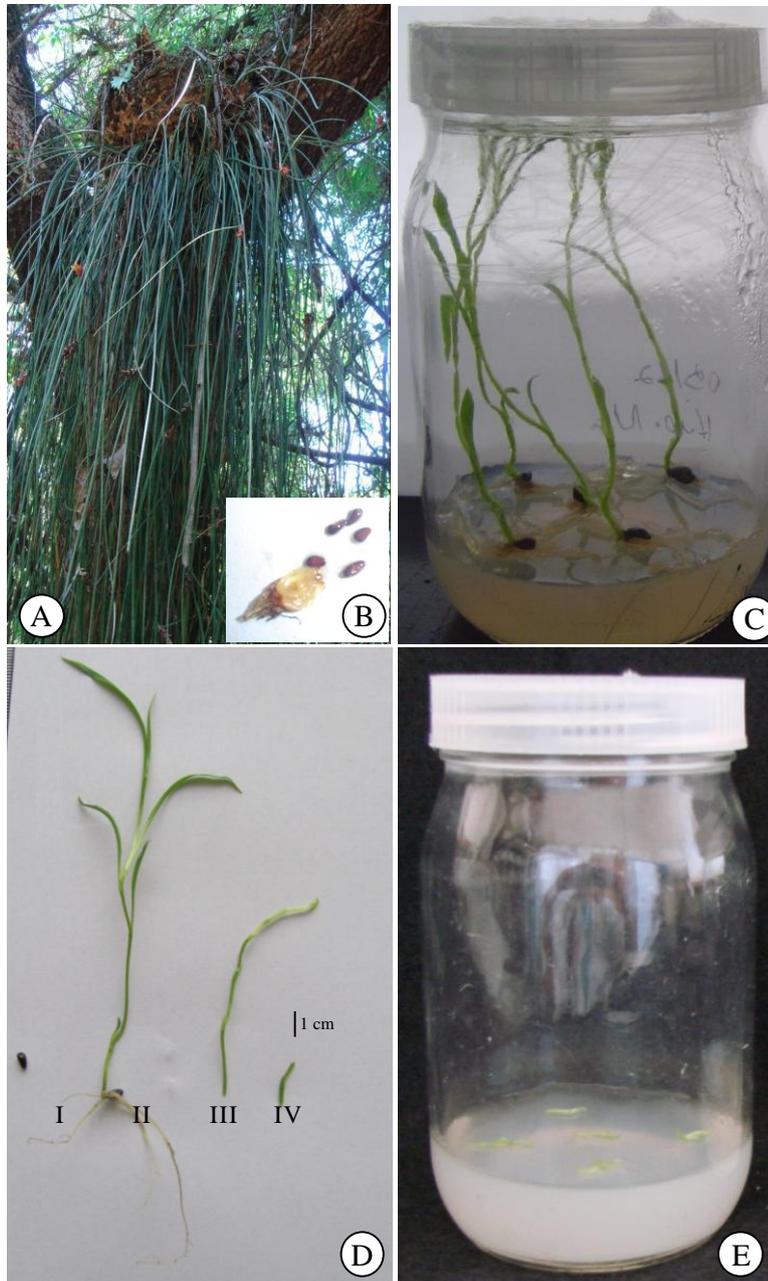


Figura 3 – (A) Planta de *Acanthostachys strobilacea* doadora de sementes. (B) Sementes recém-retiradas do fruto. (C) Plantas com eixo caulinar alongado obtidas a partir do cultivo *in vitro* de sementes. (D) Método de obtenção de segmentos nodais: (I) semente de *A. strobilacea*, (II) muda de *A. strobilacea* alongada a partir do cultivo *in vitro* de sementes, (III) eixo caulinar sem folhas e raízes e (IV) segmento nodal isolado do eixo caulinar. (E) Deposição do nó em meio nutritivo com diferentes tratamentos descritos a seguir e mantidos em diferentes temperaturas por um período de 90 dias.

### 3.3 Avaliação da influência da temperatura no crescimento e desenvolvimento de *A. strobilacea*

Segmentos nodais (1 cm de comprimento) foram isolados a partir das plantas alongadas *in vitro*, e transferidos para frascos com 40 ml de meio (figura 3D), como descrito acima, e mantidos, durante 3 meses, em câmara de germinação ajustada a 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, com fotoperíodo de 12 horas e  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiância fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram® super luz do dia 40 W). Após 90 dias de cultivos, foram quantificados o número de folhas, nós e raízes, comprimento médio da maior folha, raiz e comprimento do entrenó, massa fresca e seca das partes aéreas e caulinar, além de conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Lichtenthaler 1987), conforme descrito no item 5.6.

Os segmentos nodais que não apresentaram desenvolvimento da gema lateral foram transferidos para a temperatura de 25 °C por 3, 6 e 12 meses, de modo a verificar se houve morte ou apenas parada no desenvolvimento devido à temperatura baixa.

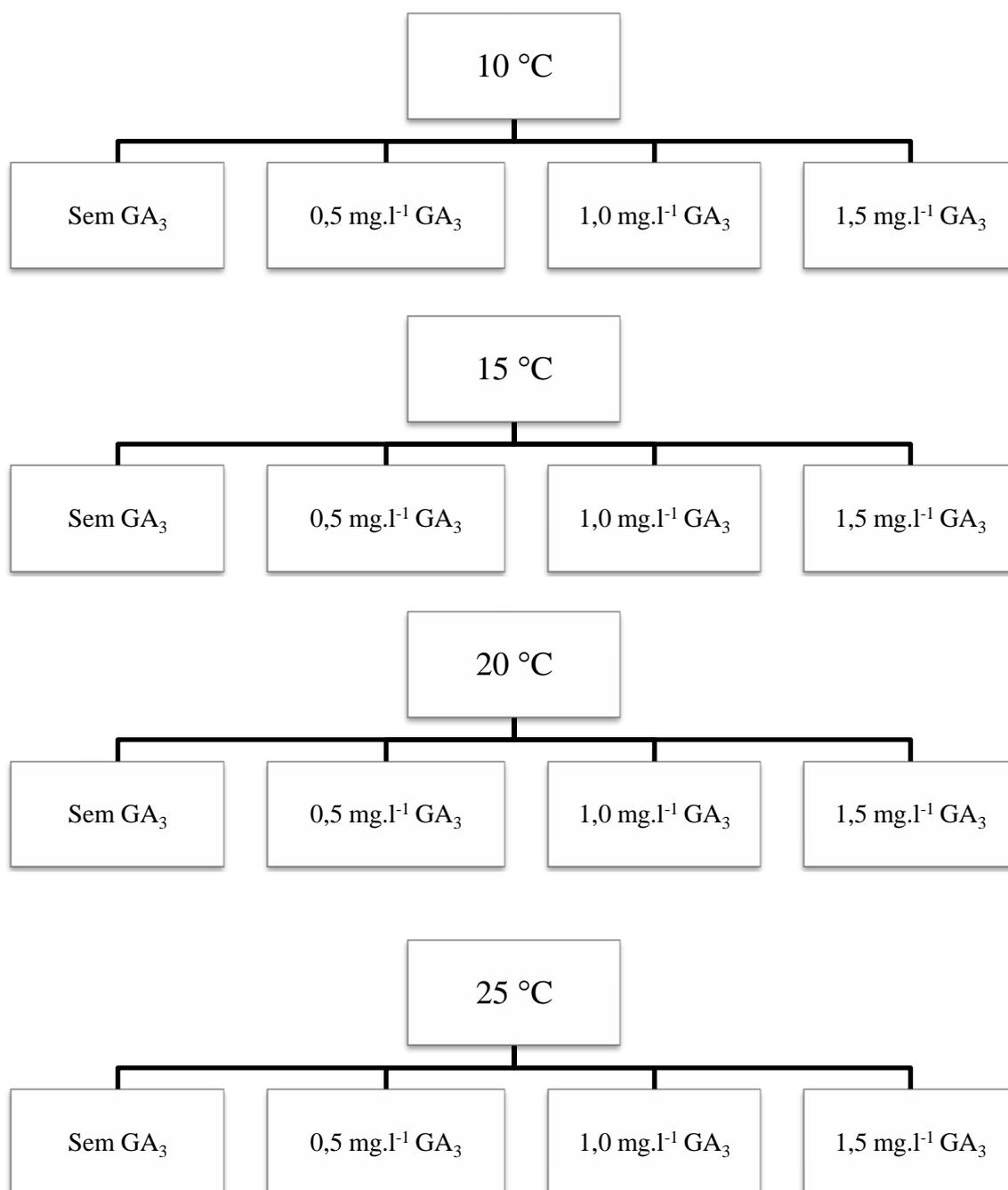
### 3.4 Avaliação da influência do ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) sobre o crescimento *in vitro* de *A. strobilacea* em diferentes temperaturas

De modo a verificar a influência da giberelina no crescimento e alongamento do eixo caulinar de plantas de *A. strobilacea*, foram realizados testes com a presença de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) no meio de cultura por meio de duas técnicas: na primeira, o  $\text{GA}_3$  foi adicionado ao meio de cultura, que, em seguida, foi submetido à esterilização em autoclave por 15 minutos a 121 °C; no segundo,  $\text{GA}_3$  e paclobutrazol (PBZ, inibidor da síntese de GA) foram ultrafiltrados e adicionados ao meio de cultura, após este ter sido esterilizado. Usando inibidores da biossíntese de GA, como paclobutrazol, que bloqueia a biossíntese de GA na fase de oxidação do ácido *ent*-caureno a *ent*-caurenóico (Hedden 1990), é possível reduzir o alongamento caulinar em algumas plantas. Assim, a utilização do PBZ visa verificar o papel da giberelina endógena no alongamento caulinar de *A. strobilacea*.

#### 3.4.1 Ácido giberélico submetido à autoclave

Foi adicionado ao meio de cultura  $\text{GA}_3$  nas seguintes quantidades: 0,5; 1,0 e 1,5 mg.l<sup>-1</sup>; além de um tratamento controle sem adição do fitorregulador no meio MS/5. Oito frascos

contendo 6 segmentos nodais cada permaneceram 90 dias em câmara de germinação ajustados em 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, fotoperíodo de 12h e a irradiância de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  segundo desenho esquemático experimental a seguir (figura 4). Após 90 dias de cultivos, foram quantificados o número de folhas, nós e raízes, comprimento médio da maior folha, raiz e comprimento do entrenó, massa fresca e seca das partes aéreas e caulinar, além de conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Lichtenthaler 1987), conforme descrito no item 5.6.



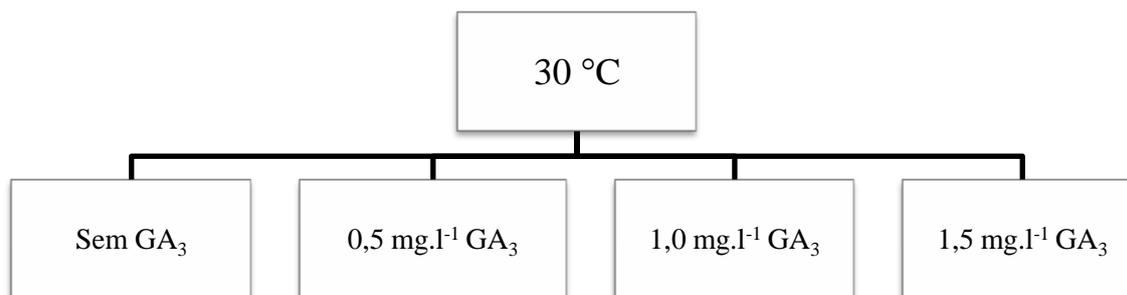
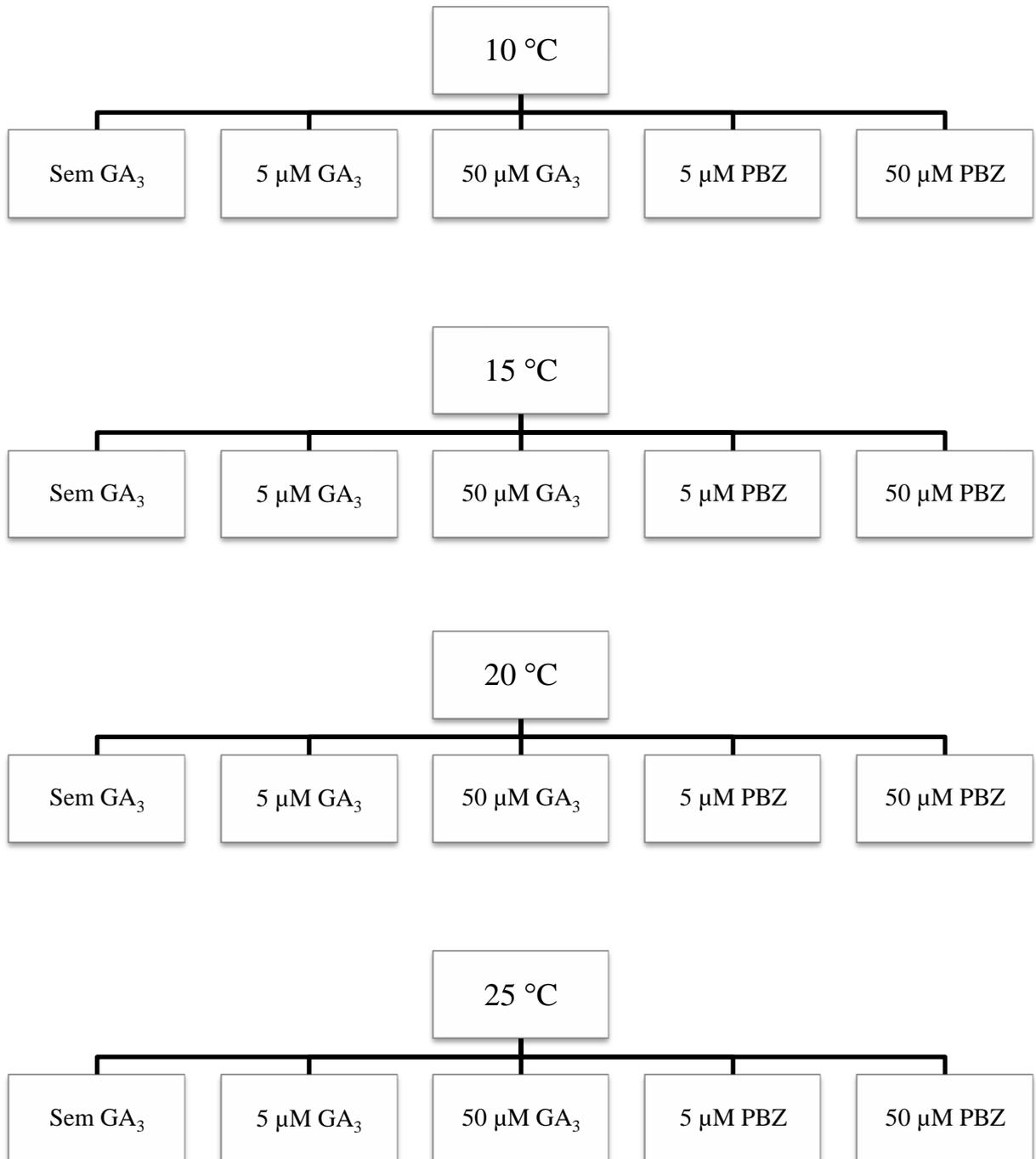


Figura 4 - Esquemática dos experimentos com segmentos nodais de *A. strobilacea* cultivados *in vitro* em 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, em meio nutritivo contendo 0,5; 1,0; 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e meio MS/5 sem fitorregulador adicionados ao meio de cultura antes da esterilização em autoclave.

### 3.4.2 Ácido giberélico ultrafiltrado

Após a obtenção dos resultados do teste descrito no item 5.4.1, foi constatado um efeito inibitório do ácido giberélico em alguns parâmetros avaliados na planta, conforme descritos no item 4.2. Assim, surgiu a dúvida se as respostas de *A. strobilacea* tratadas com ácido giberélico estariam associadas com uma possível degradação do fitorregulador durante a esterilização em autoclave. Dessa forma, optou-se por repetir o experimental, alterando a metodologia de incorporação do fitorregulador ao meio nutritivo. Após a esterilização em autoclave por 15 minutos, o meio MS/5 foi levado à câmara de fluxo laminar, onde foram adicionados em tratamentos separados 5 e 50 µM de ácido giberélico e 5 e 50 µM de paclobutrazol, ambos ultrafiltrados em membrana de celulose (poros com 0,45 µm Millipore filters). Oito frascos, contendo seis segmentos nodais cada um, permaneceram 90 dias em câmara de germinação ajustados em 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, fotoperíodo de 12h e a irradiância de 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, segundo desenho esquemático experimental a seguir (figura 5). Após 90 dias de cultivos, foram quantificados o número de folhas, nós e raízes, comprimento médio da maior folha, raiz e comprimento do entrenó, massa fresca e seca das partes aéreas e caulinar, além de conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Lichtenthaler 1987), conforme descrito no item 5.6.



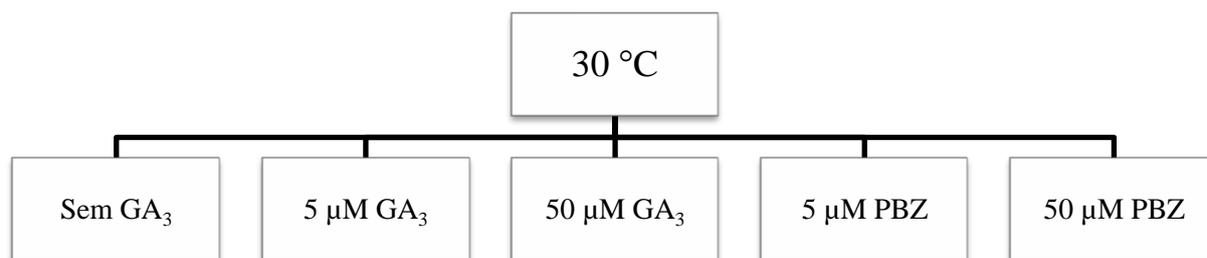


Figura 5 – Esquemática dos experimentos com segmentos nodais de *A. strobilacea* cultivados *in vitro* em 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, em meio nutritivo contendo 5 e 50 µM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 5 e 50 µM de paclobutrazol (PBZ) e meio MS/ 5 sem fitorregulador adicionados ao meio de cultura após a esterilização do em autoclave.

### 3.5 Avaliação da influência do cálcio no crescimento de plantas de *A. strobilacea* mantidas *in vitro* em diferentes temperaturas.

Foram realizados dois testes com metodologias distintas quanto à utilização do cálcio. Em um primeiro momento, as concentrações presentes no meio nutritivo MS (meio de cultura utilizado no cultivo *in vitro* de *A. strobilacea* (Santos *et al.* 2010)) foram alteradas em sua concentração de cálcio, contudo as respostas apresentadas pela planta poderiam estar relacionadas à nova composição do meio, uma vez que, conforme descrito na tabela 1, outros sais foram alterados de modo a ajustar o meio para as novas concentrações de cálcio. Assim, surgiu a necessidade de realizar um teste com a utilização de um ionóforo de cálcio, e foi adicionado no meio a ionomicina, substância que atua principalmente ao nível das reservas internas de Ca<sup>2+</sup>, de modo que aumenta as concentrações desta cátion através da ativação de estoques intracelulares (Morgan & Jacob 1994), aumentando a concentração no citoplasma e desencadeando respostas de crescimento e desenvolvimento da planta (Reddy 2001). Nesse teste foi utilizado o EGTA (etileno-glicol-bis (éter β-aminoetil) - N, N, N', N' - tetra-acético)), um quelante de cálcio que se liga ao cátion impedindo a ação deste no interior da célula (Hepler & Wayne 1985).

#### 3.5.1 Meio de Murashige & Skoog (1965) (MS) modificado em relação à concentração de cálcio

Os nós obtidos conforme descrito no item 5.2 foram depositados em frascos fechados com tampas de plástico, contendo meio nutritivo completo de Murashige & Skoog (1965),

modificado quanto ao conteúdo de cálcio da formulação original, mantendo as seguintes concentrações: 0; 0,3; 3,0; 6,0 e 9,0 mM. As concentrações dos demais elementos foram repostas por meio do uso de diferentes sais, conforme descrito na tabela 1, de modo a manter o fornecimento dos nutrientes existentes na formulação original. Oito frascos contendo seis segmentos nodais cada um permaneceram 90 dias em câmara de germinação ajustados em 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, fotoperíodo de 12h e a irradiância de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  segundo desenho esquemático experimental a seguir (figura 6). Após 90 dias de cultivos, foram quantificados o número de folhas, nós e raízes, comprimento médio da maior folha, raiz e comprimento do entrenó, massa fresca e seca das partes aéreas e caulinar, além de conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Lichtenthaler 1987), conforme descrito no item 5.6.

Tabela 1 – Tratamentos com diferentes concentrações de cálcio (0; 0,3; 3,0; 6,0 e 9,0 mM) do meio MS modificado (Kurita 2011).

Sais (g.l <sup>-1</sup> )	Tratamentos (mM Ca)				
	0 mM	0,3 mM	3 mM	6 mM	9 mM
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1,288	1,7132	1,8952	1,8952	1,8952
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1,89	1,84	1,65016	1,41016	1,1701
<b>CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>	-	0,0882	0,441	0,441	0,441
<b>MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</b>	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O</b>	-	-	-	0,7084	1,416
<b>KCl</b>	0,447	0,3576	-	-	-

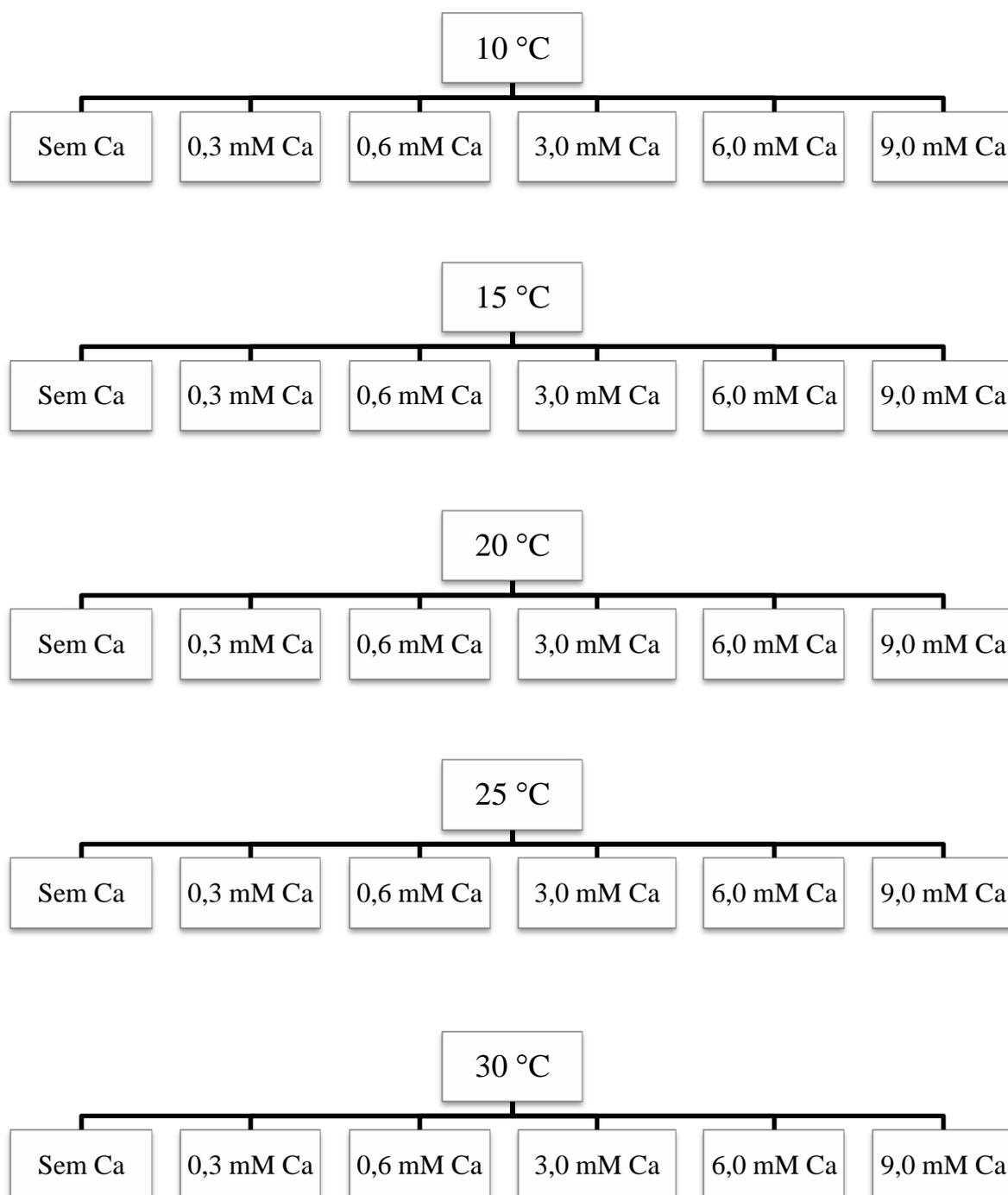
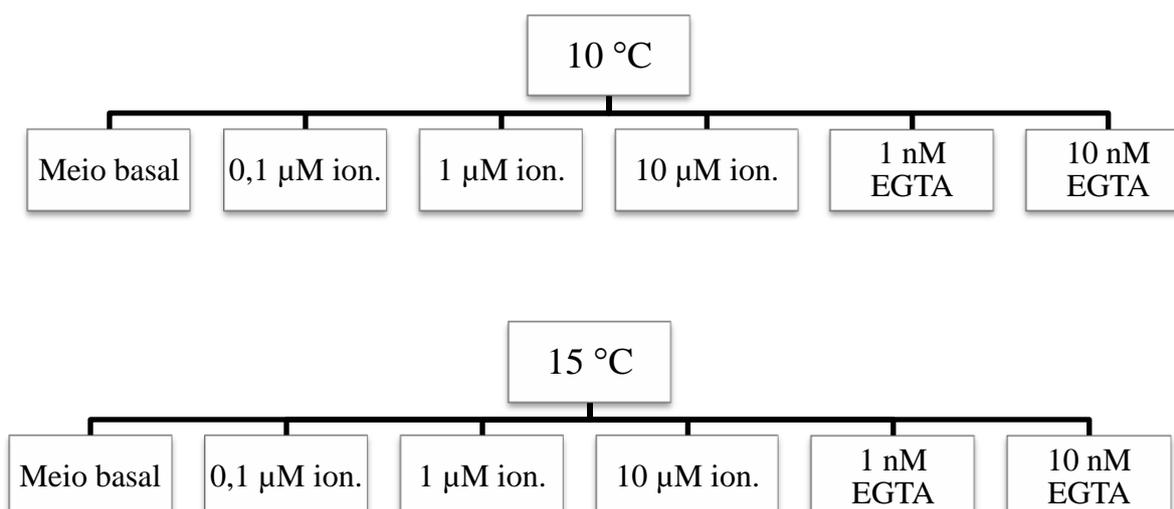


Figura 6 – Esquematização dos experimentos com segmentos nodais de *A. strobilacea* cultivados *in vitro* em 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, em meio nutritivo contendo 0,3; 0,6; 3,0; 6,0 e 9,0 mM de cálcio e meio sem o mineral.

### 3.5.2 Adição de ionomicina e EGTA no meio nutritivo

Os nós obtidos, conforme descrito no item 5.2, foram então transferidos assepticamente para frascos de 250 ml contendo 40 ml MS/5 adicionado de 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  de ionomicina (ionóforo de cálcio) e 1,0 e 10,0 mM de EGTA (etileno-glicol-bis (éter  $\beta$ -aminoetil) - N, N, N', N' - tetra-acético). Nos tratamentos com EGTA (quelante de cálcio), eliminou-se o  $\text{CaCl}_2$  do meio de cultura. Estas substâncias utilizadas nos tratamentos foram dissolvidas em água destilada e filtrada em membrana de acetato de celulose (0,45  $\mu\text{m}$  diâmetro dos poros), antes de serem adicionadas ao meio de cultura previamente esterilizado. Todos os tratamentos foram mantidos em câmaras de germinação ajustadas nas temperaturas de 10 °C, 15 °C, 25 °C e 30 °C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , segundo desenho esquemático experimental a seguir (figura 7). Para cada concentração de cálcio foram utilizados oito frascos com seis segmentos nodais. Após 90 dias, foi avaliado o número de segmentos nodais, comprimento do entrenó, teor de água, massa fresca e seca da parte aérea, além de conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Lichtenthaler 1987), conforme descrito no item 5.6.



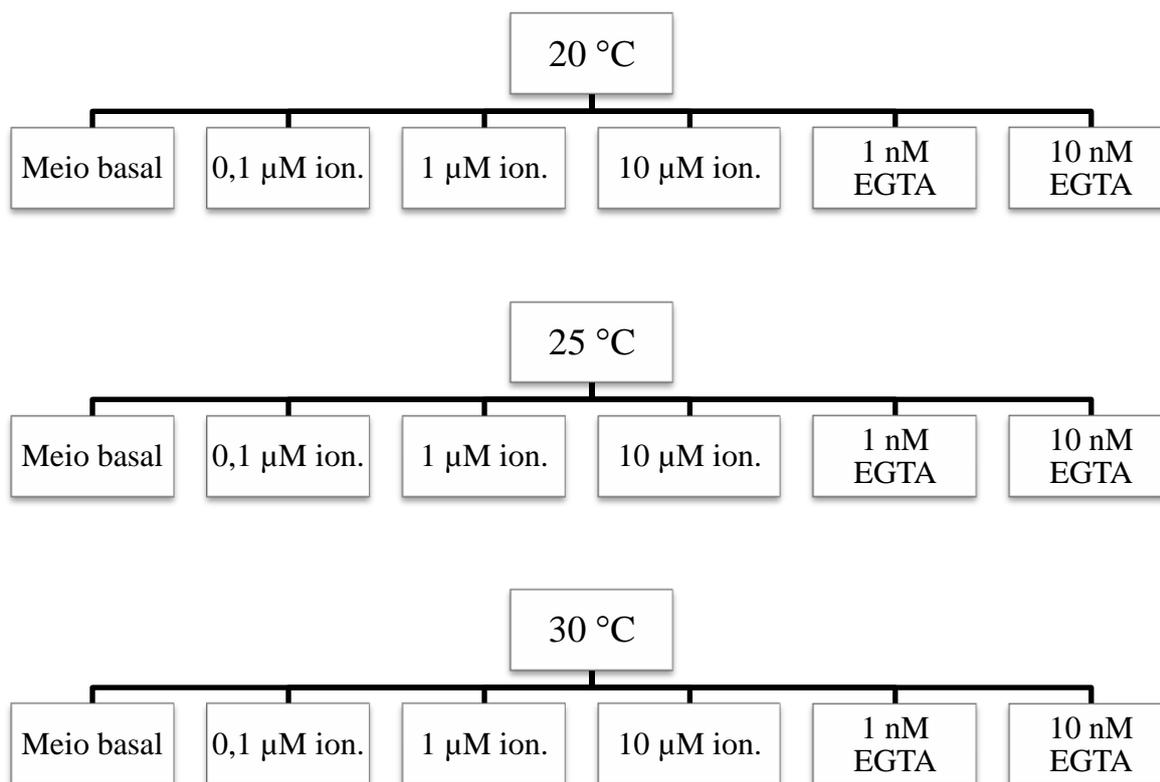


Figura 7 – Esquematização dos experimentos com segmentos nodais de *A. strobilacea* cultivados *in vitro* em diferentes temperaturas e 0,1, 1 e 10 µM de ionomicina e 1,0 e 10,0 mM de EGTA.

### 3.6 Parâmetros utilizados para avaliação das plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*.

#### 3.6.1 Porcentagem de regeneração

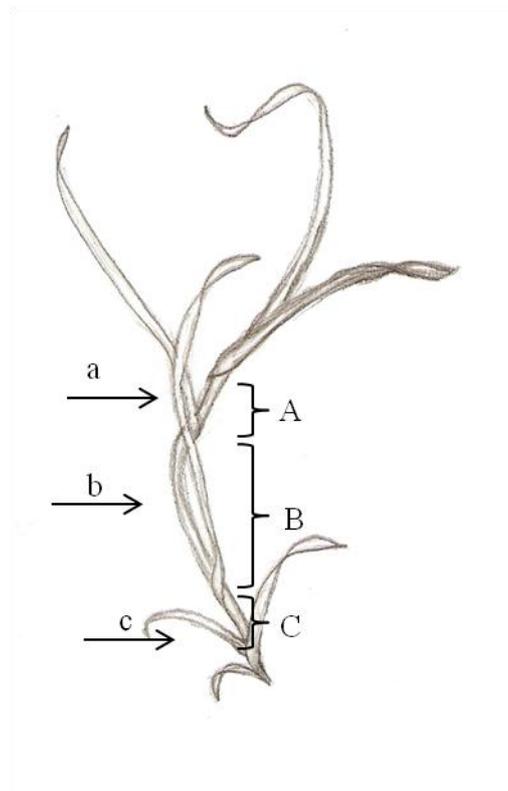
Para quantificar a regeneração dos segmentos nodais mantidos nas diferentes temperaturas de cultivo descritos no item 5.3, foi realizado o cálculo do índice de velocidade de regeneração dos segmentos nodais. O índice de velocidade de regeneração (IVR) foi calculado usando a abordagem clássica modificada de Maguirre (1962):

$$IVR = \left(\frac{G_1}{n_1}\right) + \left(\frac{G_2}{n_2}\right) + \dots + \left(\frac{G_n}{n_n}\right)$$

Nesse caso, Gn = número de nós com gemas laterais desenvolvidas com cerca de 0,5 cm de comprimento e Nn = número de dias a partir da deposição de nós no meio nutritivo com 100% de desenvolvimento.

### 3.6.2 Análise biométrica

Foram avaliadas 25 plantas com 90 dias de cultivo em de cada tratamento, quanto ao número de raízes e folhas e, também, quanto ao comprimento da raiz mais longa e da folha mais longa. Número de nós e comprimento médio do entrenó, conforme figura 7.



$$\text{comprimento médio do entrenó} = \frac{A + B + C \dots (cm)}{a + b + c \dots (un)}$$

Figura 7 – Desenho esquemático de uma planta geral demonstrando o método de obtenção do comprimento médio do entrenó das plantas submetidas aos diferentes testes, o que determina o alongamento do eixo caulinar.

### 3.6.3 Determinação de massa

Após 90 dias de cultivo nos diferentes tratamentos, foram retiradas plantas ao acaso de cada frasco para a determinação da massa fresca e seca. O número de plantas (de 1 a 15) variou de acordo com o comprimento. As plantas foram divididas em parte aérea e raiz, utilizando-se três amostras compostas para cada coleta. As medidas de massa seca foram obtidas após secagem em estufa a 60 °C, até atingir massa constante.

### 3.6.4 Taxa de Crescimento Relativo

Plantas submetidas a diferentes temperaturas descritas no item 5.3 foram coletadas quinzenalmente para cálculo da Taxa de Crescimento Relativo (TCR). A TCR é a variação ou incremento em massa, altura, número de folhas, ou qualquer outro parâmetro de avaliação de crescimento, ao longo de um determinado período, estando diretamente relacionada ao valor alcançado no período anterior (Benincasa 2003). Foram utilizados os dados de número, comprimento e massa seca de folhas e raízes das plantas cultivadas *in vitro* para os cálculos das TCR.

$$TCR = [(LnP2 - LnP1)](t2 - t1)^{-1}$$

Explicitando:

$Ln$  é o logaritmo natural,  $P2$  é o valor atual do parâmetro,  $P1$  é o valor anterior do parâmetro e  $t$  é o tempo (índice 1 = valor inicial e índice 2 = valor final).

### 3.6.5 Determinação do teor de clorofila e de carotenoides

Amostras compostas de folhas provenientes de plantas submetidas aos tratamentos descritos anteriormente foram congeladas a -20 °C para a quantificação de clorofilas e de carotenoides, segundo técnica descrita por Lichtenthaler (1987), utilizando-se três amostras para cada coleta. O material vegetal congelado foi macerado em acetona pura gelada e filtrado em papel, sendo o filtrado coletado em balão volumétrico de 25 ml. O volume do balão foi completado com acetona pura para 25 ml. As absorbâncias das clorofilas foram lidas a 662 e

645 nm (clorofilas a e b, respectivamente) e a dos carotenoides a 470 nm. As concentrações dos pigmentos foram determinadas de acordo com as equações definidas em Lichtenthaler (1987). Os valores obtidos estão expressos em mg do pigmento por 1 ml de extrato.

$$\begin{aligned}
 Cla &= (11,24 * A_{662}) - (2,04 * A_{645}) \\
 Clb &= (20,13 * A_{645}) - (4,19 * A_{662}) \\
 Cla + Clb &= (7,05 * A_{662}) + (18,09 * A_{645}) \\
 Carotenoides &= \frac{(1000 * A_{470}) - (1,9 * Cla) - (63,4 * Clb)}{214}
 \end{aligned}$$

Define-se aqui: *Cla* = quantidade de clorofila a, *Clb* = quantidade de clorofila b, *Ax* = absorvância nos respectivos comprimentos de onda.

### 3.6.7 Análise anatômica

Esta etapa do trabalho foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Anatomia do Instituto de Botânica de São Paulo. Foram selecionados segmentos nodais com 3 meses de desenvolvimento nas diferentes temperaturas, conforme item 5.3. As plantas foram fixadas em FAA50 (formalina - ácido acético - etanol a 50 %, 1:1:18) durante 24 horas e armazenados em etanol a 70 % (Johansen 1940). O material foi processado por métodos convencionais para Leica historesina ® (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha), e seccionados em 5-7 mM de espessura. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (Sakai 1973) e montados em água. As lâminas foram observadas e fotografadas digitalmente com um microscópio composto Olympus BX53 equipado com uma câmera digital Olympus Q -Color 5 com imagem Pro software Expresso 6.3.

### 3.7 Análise estatística

As médias obtidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) fator único para o teste de temperatura somente, e ANOVA-2 fatores para os demais. Para comparação entre as médias, foi aplicado teste de Tukey com nível de significância de 5 %. Foi realizada uma análise multivariada aplicada aos valores obtidos em cada uma das variáveis dos testes de cálcio e ácido giberélico através da análise de componentes principais (PCA), utilizando-se o

programa Pcord6. Essa análise teve como objetivo expressar a complexidade das relações existentes entre o conjunto de variáveis e reduzir a dimensionalidade dos dados, com combinações lineares das variáveis originais em um novo conjunto de menor número de variáveis.

## **4. Resultados e Discussão**

### *4.1 Avaliação da influência da temperatura no crescimento*

A temperatura de cultivo *in vitro* influenciou o crescimento das plantas de *A. strobilacea*. No presente trabalho foi observado que a temperatura de cultivo influencia tanto no crescimento da planta, quanto no desenvolvimento da gema lateral presente no nó e no alongamento caulinar de *A. strobilacea* cultivada *in vitro*. A tabela 2 mostra que o tempo de emergência da gema lateral presente no segmento nodal de *A. strobilacea* foi dependente da temperatura de cultivo. Observou-se que quanto maior a temperatura, menor o tempo necessário para o desenvolvimento da gema originar a planta. Quando mantidos em 30 °C, os segmentos nodais apresentaram desenvolvimento normal nos primeiros 15 dias de cultivo *in vitro*. Já naqueles mantidos sob 20 e 25 °C o desenvolvimento surgiu somente aos 30 dias, com porcentagem de regeneração de 45 e 100 % respectivamente após esse período. Ou seja, os segmentos nodais mantidos em 25 °C regeneraram mais rápido do que aqueles mantidos sob 20 °C, que atingiram a totalidade de regeneração apenas 15 dias mais tarde. Sob condição térmica de 15 °C o desenvolvimento do segmento nodal ocorreu apenas após 60 dias. Entretanto, quando mantidos a 10 °C, os segmentos nodais não se desenvolvem durante os 90 dias de observação. O índice de velocidade de emergência da gema lateral (IVR) também foi influenciado pela temperatura, ou seja quanto maior a temperatura, mais rápido ocorre o crescimento da gema e surgimento da planta (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de regeneração dos segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* cultivados *in vitro* em 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, quantificados quinzenalmente por um período de 90 dias e calculado o índice de velocidade de emergência da gema lateral (IVR).

Temperatura	Período de observação					IVR
	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	90 dias	
10 °C	0	0	0	0	0	0,0
15 °C	0	0	0	84	100	0,7
20 °C	0	45	72	100	100	1,2
25 °C	0	100	100	100	100	1,5
30 °C	67	100	100	100	100	2,0

Valores expressos em % regeneração (exceto IVR - Fórmula descrita no item 3.6.1)

De modo interessante, embora os segmentos nodais cultivados a 10 °C não tenham apresentado desenvolvimento da gema lateral, mesmo tendo sido mantidos por até um ano de observação, quando retirados aos 3, 6 e 12 meses e transferidos para 25 °C, apresentaram desenvolvimento da gema lateral indicando que a temperatura baixa não causou dano nos tecidos do explante. O fato de não terem originado plantas deveu-se ao efeito inibitório da temperatura baixa. Contudo, a porcentagem de desenvolvimento da gema lateral variou conforme o período que os explantes eram mantidos a 10 °C. Quando armazenados por 3 meses, as gemas laterais se desenvolveram normalmente após aproximadamente 25 dias. Contudo quando mantidos por 6 meses a 10 °C, a capacidade do segmento nodal em formar plantas reduziu consideravelmente, sendo observado apenas 1 gema durante 3 meses de observação, após 12 meses mantidos em 10 °C, não houve regeneração de nenhum segmento nodal como mostra a tabela 3. Esses resultados indicam a tolerância de segmentos nodais de *A. strobilacea* a baixas temperaturas. Porém, quando o objetivo é armazenar material genético na forma de segmento nodal, deve-se atentar para o período máximo de 3 meses. O aumento do tempo necessário para emergência da gema observado no cultivo dos segmentos nodais em baixa temperatura, bem como a não regeneração dos nós mantidos em 10 °C, pode estar relacionado a menor diferenciação dos meristemas da parte aérea nessas temperaturas (Amoo *et al.* 2009). Para *A. strobilacea*, pode ser recomendável, portanto, a manutenção desse tipo de explante por um período curto. Diferentes métodos *in vitro* de conservação são empregados, dependendo o tempo de armazenamento requerido. Para o armazenamento de curto prazo, o

objetivo é reduzir o crescimento e aumentar os intervalos entre as subculturas (González-Benito *et al.* 2010; Engelmann 2011).

Não foram encontrados trabalhos onde há uma relação entre o desenvolvimento de explante de Bromeliaceae e a temperatura. Contudo, Mollo (2009) verificou a influência da temperatura baixa sobre a germinação de sementes da bromélia *Alcantarea imperialis* e constatou que as sementes germinaram em 50 dias quando mantidas em 15 °C, e em 14 dias quando mantidas em 30 °C. Vieira *et al.* (2007), constataram que a faixa de temperatura ideal para germinação da bromélia *Dyckia tuberosa* varia de 15 a 40 °C, e quando cultivadas em 10 °C não houve germinação. Apesar dos trabalhos mencionados anteriormente se referir a influência da temperatura sobre a germinação de sementes, Carvalho *et al.* (2014) verificaram que não há diferenças entre as plantas de *A. strobilacea* obtidas a partir de sementes e de segmentos nodais durante o cultivo *in vitro* a 25 °C, o que conclui-se que a propagação *in vitro* de *A. strobilacea* por sementes é tão eficaz como a propagação por segmentos nodais.

Tabela 3 – Período de armazenamento *in vitro* de segmentos nodais de *A. strobilacea* a 10 °C e o número de nós desenvolvidos em 25 °C.

Período de armazenamento a 10 ° C	Número de nós desenvolvidos (un) (n=45)
3 meses	45
6 meses	1
12 meses	-

Durante o processo de desenvolvimento da gema lateral, presente no segmento nodal, após o mesmo ser isolado da planta doadora, a divisão e diferenciação celular são iniciadas por sinalização específica e ocorre de maneira coordenada. Foi demonstrado por Rymen *et al.* (2007), que baixa temperatura afeta o ciclo celular em folhas de milho, e que a inibição do crescimento observado nestas condições está fortemente ligada à redução da produção de novas células. Esta redução é uma consequência da duração prolongada do ciclo celular. A divisão celular nas plantas é controlada pela atividade dos complexos de proteínas cinase dependentes de ciclina (CDK), cuja atividade é regulada, entre outros, pela temperatura (Dewitte & Murray 2013). Além disso, em baixas temperaturas há uma redução da cinética de reações metabólicas, alterando o equilíbrio termodinâmico de tal modo que aumenta a probabilidade das cadeias laterais não polares das proteínas se exporem ao meio aquoso da

célula, levando a uma perturbação da estabilidade proteica ou dos complexos de proteína, alterando os mecanismos de regulação metabólico (Ruelland *et al.* 2009). Contudo, os resultados revelaram que os danos no metabolismo do meristema lateral presente no segmento nodal de *A. strobilacea* ocorreu apenas quando as plantas permaneceram em 10 °C por um período superior a 3 meses, uma vez que não houve a retomada do crescimento quando o nó foi transferido para 25 °C, diferentemente do observado para os nós armazenados por até três meses a 10 °C, que mostraram regeneração a plantas normais quando transferidos à condição térmica ideal de cultivo.

Foram realizadas análises biométricas quinzenalmente das plantas regeneradas de modo a verificar a taxa de crescimento relativo das plantas mantidas nas diferentes temperaturas. O crescimento é caracterizado pelo aumento irreversível no acúmulo de massa, portanto, os parâmetros escolhidos para ilustrar o crescimento das plantas foram: massa seca das partes aérea e radicular. Os resultados mostraram que, além da influência no desenvolvimento da gema lateral, a temperatura pode regular a taxa de crescimento relativo da planta (figura 8). Quando os segmentos nodais foram mantidos em 25 e 30 °C, as maiores taxas de crescimento relativo da massa seca da parte aérea das plantas originárias do desenvolvimento da gema lateral foram observadas aos 45 dias de cultivo, sendo a maior taxa observada em 30 °C, plantas mantidas em 20 °C apresentaram a maior taxa aos 60 dias de cultivo e quando mantidas em 15, somente aos 90 dias de cultivo. Para a massa seca da raiz das plantas a 25 °C, as maiores TCR foram observadas aos 45 dias de cultivo, assim como aquelas em 30 °C. Sob 20 °C, maior taxa ocorreu aos 90 dias de cultivo *in vitro*, ou seja, a taxa de crescimento foi mais lenta nessa condição térmica. Em resumo, plantas cultivadas em 15 °C apresentam TCR menor, quando comparadas com 20 e 25 °C (que apresentam pouca diferença entre si), e com 30 °C, onde as plantas crescem em taxas maiores. Porém, houve uma grande diferença no aspecto morfológico entre as plantas mantidas em 15, 20 e 25 °C em relação àquelas cultivadas em 30 °C como mostra a figura 10. Diversos trabalhos mostram que a temperatura influencia a velocidade de crescimento das plantas. De acordo com Adams *et al.* (2001), plantas de *Lycopersicon esculentum* crescem normalmente em 22 e 18 °C, porém, quando cultivadas em 14 °C, tem sua taxa de crescimento e o acúmulo de massa reduzidos. Estes autores concluíram que baixas temperaturas reduzem tanto taxas de crescimento do volume absoluto do fruto da espécie, como retardam o tempo para que a taxa de crescimento absoluto se torne máxima.

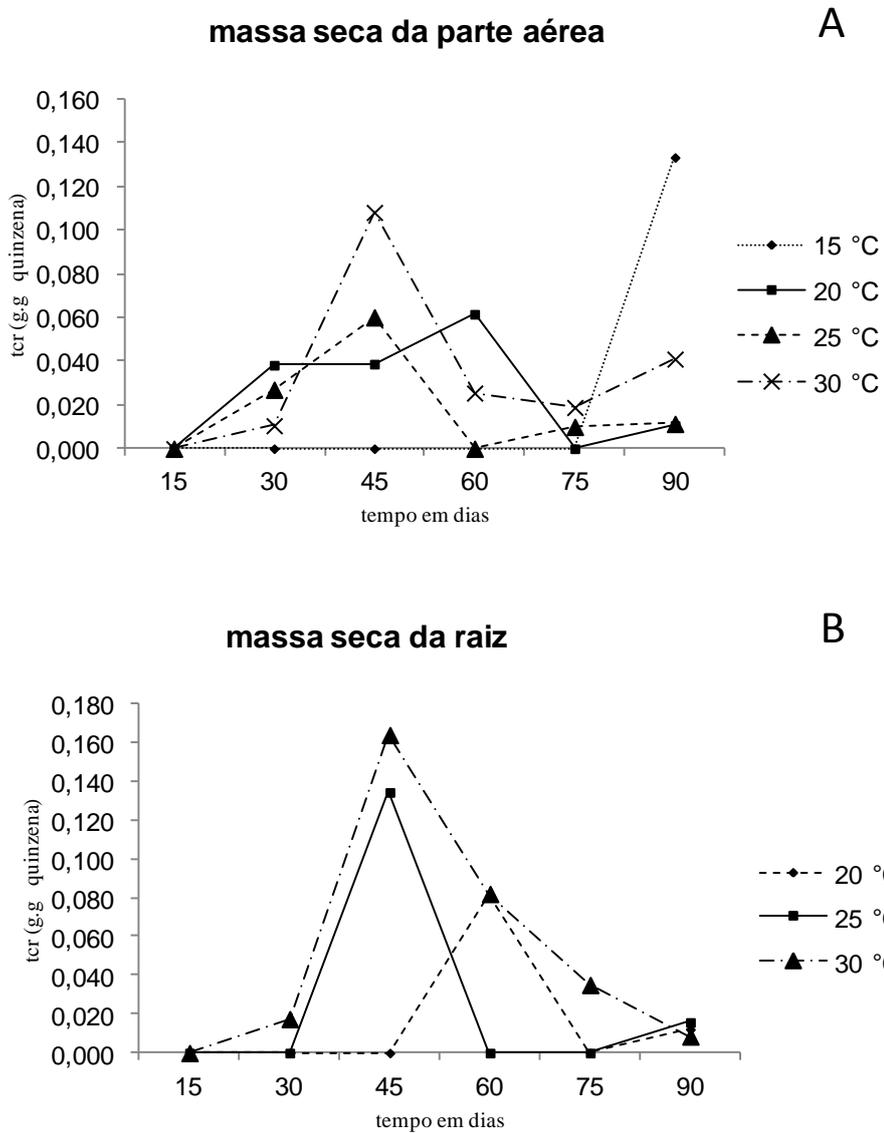


Figura 8 – Taxa de crescimento relativo da massa seca da parte aérea (A) e da raiz (B), quantificados quinzenalmente, por um período de 90 dias de cultivo *in vitro* de *A. strobilacea*.

A figura 9 mostra o aspecto morfológico das plantas obtidas por meio do cultivo de segmentos nodais nas temperaturas de 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C. Esses resultados mostraram a influência da temperatura no crescimento e morfologia de *A. strobilacea*. Em 10°C, não houve regeneração da planta (Figura 9A), conforme descrito anteriormente. Os segmentos nodais mantidos em 15 °C desenvolvem até 4 un de folhas durante os 3 meses de cultivo, inclusive com desenvolvimento radicular (Figura 9B). As plantas cultivadas em 20 °C apresentaram eixo caulinar curto (Figura 9C), assim como as plantas mantidas em 15 °C, aspecto morfológico típico de bromélias. E as plantas mantidas em 25 e 30 °C apresentaram alongamento do eixo caulinar evidenciando os segmentos nodais presentes no caule (Figura 9D e E, respectivamente), sendo que as plantas mantidas em 30 °C apresentaram alterações na coloração.

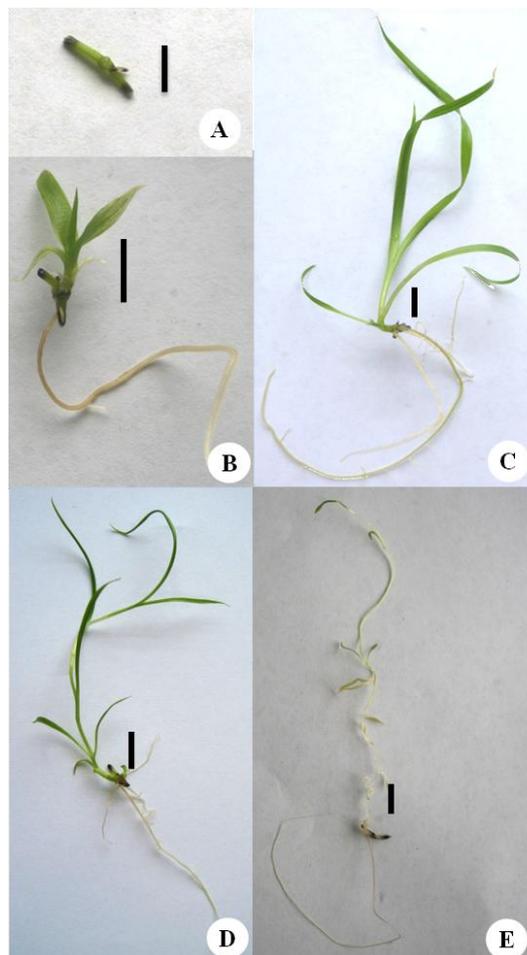


Figura 9. Plantas de *Acanthostachys strobilacea* obtidas a partir do cultivo *in vitro* de segmentos nodais mantidos por 3 meses em 10 °C (A), 15 °C (B), 20 °C (C), 25 °C (D) e 30 °C (E). Barra =1.0 cm.

Assim, é possível manter a planta cultivada *in vitro* por um maior período, reduzindo a necessidade de subcultivos, quando comparado com as plantas cultivadas em 25 °C, condição térmica ótima de micropropagação da espécie (Santos *et al.* 2010). O crescimento lento verificado em 15 °C oferece uma potencial estratégia para o armazenamento *in vitro* de germoplasma de *A. strobilacea*. Este trabalho mostrou ser essa a temperatura ideal para a manutenção do cultivo *in vitro* sob crescimento lento, quando a cultura é iniciada a partir do segmento nodal. Entretanto Carvalho *et al.* (2014) verificaram que quando a formação da coleção *in vitro* ocorre a partir das plantas de *A. strobilacea* já formadas, com cerca de 1 mês de idade, foi verificado ser possível manter as culturas sob temperaturas menores (10 °C). A adaptação da espécie às temperaturas baixas pode estar relacionada ao ambiente natural ocupado por *A. strobilacea*, por ser uma espécie que ocorre no Cerrado, a uma temperatura média anual em torno de 22 a 23 °C, sendo que as médias mensais apresentam grande variação. Nesse local, as máximas absolutas mensais não variam muito ao longo dos meses do ano, podendo chegar a mais de 40 °C e as mínimas absolutas mensais variam bastante, atingindo valores próximos ou até abaixo de zero, nos meses de maio, junho e julho (Klein 2000), comprovando a hipótese formulada neste trabalho sobre a possibilidade de estabelecimento de cultivo sob crescimento lento utilizando baixas temperaturas para bromélias tropicais.

A redução do crescimento por baixas temperaturas também foi observada para outras espécies de bromélias cultivadas *in vitro*, como relatado por Nievola *et al.* (2005), para planta de *Ananas comosus*, onde foi observado uma redução no crescimento das plantas cultivadas em termoperíodo de 28 °C, ao dia, e 15 °C, à noite, em comparação àquelas mantidas em temperatura constante de 28 °C. Pedroso *et al.* (2010) também mostraram a redução do crescimento para a bromélia *Vriesea inflata* cultivada *in vitro* a 15 °C em comparação a um lote de plantas dessa espécie mantido a 28 °C.

O crescimento das plantas mantidas em 15 °C foi significativamente menor quando comparadas com as plantas das demais condições térmicas testadas (Figura 10), em que o número e comprimento das folhas e raízes foram significativamente menores, quando comparadas com as plantas mantidas nas demais condições térmicas. Em relação à parte aérea, o número de raízes das plantas mantidas em 15 °C foram 1,5 vezes menores, quando comparado com as plantas mantidas em 25 °C, e o comprimento foi 5 vezes menor. Com relação ao sistema radicular, tanto o número de raízes quanto o comprimento foram 3 vezes menor em comparação às plantas mantidas em 25 C.

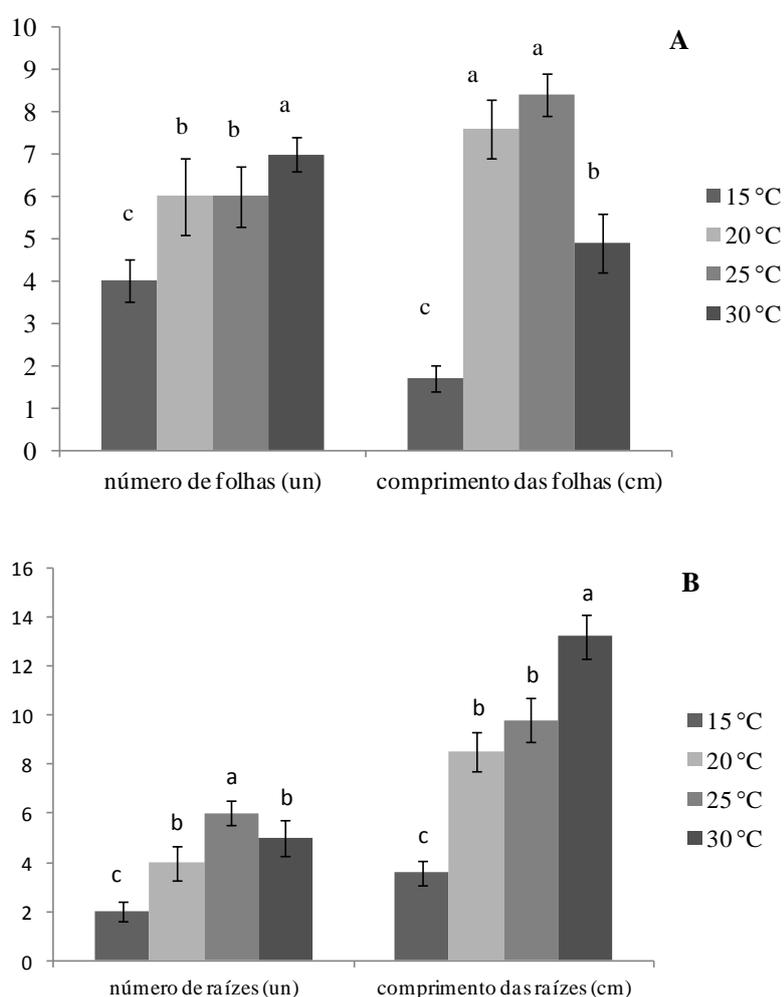


Figura 10 – Número e comprimento de folhas (A), número e comprimento de raízes (C), de plantas obtidas por meio do cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *A. strobilacea* em diferentes temperaturas por 3 meses.

A redução do crescimento também foi verificada para os resultados obtidos com a quantificação das massas fresca e seca das partes aérea e radicular, demonstrada na figura 11. Quando mantidas em 15 °C, as plantas apresentaram menores conteúdos de massa fresca e seca da parte aérea, aumentando significativamente até 25 °C, e decrescendo novamente em 30 °C. Assim, este trabalho mostrou que o limite térmico superior para o cultivo *in vitro* da bromélia *A. strobilacea* é de 30 °C.

Went (1953) já relatava que temperaturas ótimas para o crescimento das plantas são, em geral, 25 °C ou mais. Esse resultado foi também observado para *A. strobilacea* cultivada *in vitro*. Amoo *et al.* (2009), estudando os efeitos da temperatura, fotoperíodo e tamanho do frasco de cultivo na produção de brotações adventícias de *Huernia hystrix*, verificaram que, embora não houvesse diferença significativa no número de brotações produzidas por explantes mantidos em diferentes temperaturas, o número de brotações com cerca de 5-10 mm de comprimento foi maior com o aumento da temperatura. Por outro lado, o número de brotações superiores a 10 mm de comprimento diminuiu significativamente com o aumento da temperatura, onde foi menor nas plantas cultivadas em 15 °C em relação às aquelas a 20, 25, 30 e 35 °C. Para o comprimento da parte aérea, foi observada uma relação inversa, onde foi maior de acordo com o aumento da temperatura estudada. Esses resultados concordam com os obtidos com *A. strobilacea*, onde observa-se que, em 15 °C, há uma redução nos parâmetros avaliados, alcançando o pico ótimo em 25 °C e decaindo em alguns (como massas fresca e seca da parte aérea), quando mantida a 30°C. Na maioria dos parâmetros, não foram observadas diferenças entre as plantas mantidas em 25 e 30 °C, onde, possivelmente, há necessidade de aumentar a temperatura para observar redução destes parâmetros. O número de raízes foi significativamente maior nas plantas cultivadas em 25 °C e maior comprimento nas plantas cultivadas em 30 °C.

A redução do crescimento por baixas temperaturas é uma vantagem na área de conservação *in vitro*. E isto é possível por meio da diminuição da velocidade das reações químicas durante o metabolismo da planta, o que é desejável para evitar-se subcultivos frequentes, potencializando a manutenção de um banco de germoplasma de espécie de interesse comercial, ornamental e/ ou ecológico. Nesse sentido, alguns trabalhos estudam a redução do crescimento por meio da alteração da temperatura de cultivo *in vitro* de algumas espécies de modo a diminuir o subcultivo e de manter a capacidade das plantas de retomar o seu crescimento quando transferidas a condições favoráveis. Banerjee & Langhe (1985)

verificaram que plantas de *Musa* sp suportam armazenamento a 15 °C, por um período de 13 a 17 meses, dependendo do cultivar. Para plantas de *A. strobilacea*, esta temperatura também parece ser a mais adequada para o armazenamento *in vitro*. Jouve *et al.* (2000), estudando aclimação ao frio de *Populus tremula* em temperaturas não congelante, observaram que a espécie foi conservada com eficiência por mais de um ano *in vitro*, a 10 °C, em meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962), com grande limitação no crescimento sem afetar a sobrevivência da planta. Resultado similar foi encontrado para *A. strobilacea*, contudo, diferentemente do trabalho acima citado, não houve qualquer desenvolvimento do segmento nodal cultivado nesta temperatura. Esse resultado mostra a possibilidade de armazenamento do explante por um período de 3 meses a 10 °C.

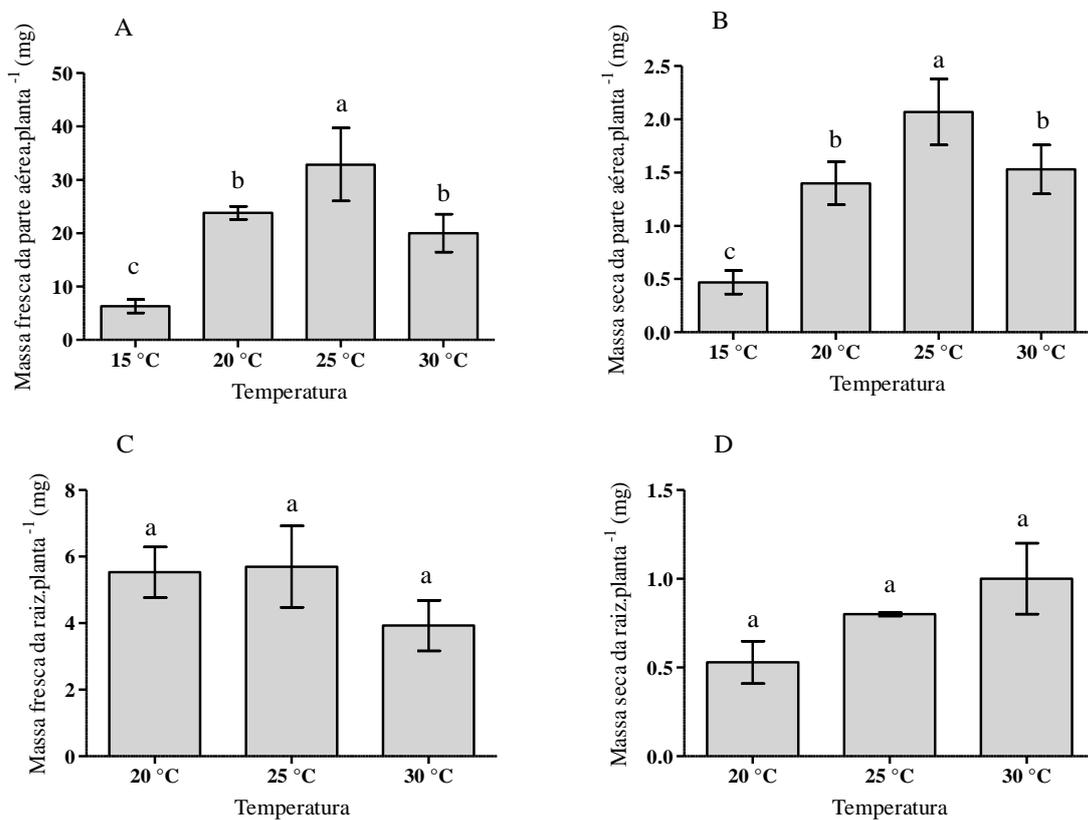


Figura 11 – Massa fresca das partes aérea (A) e radicular (C), e massa seca das partes aérea (B) e radicular (D) de plantas de *A. strobilacea* obtidas por meio do cultivo *in vitro* de segmentos nodais em diferentes temperaturas por 3 meses.

A redução do crescimento das plantas mantidas em 15 °C pode estar relacionado ao metabolismo de carboidratos. Hilliard & West (1970) observaram que o crescimento de *Digitaria decumbens* é severamente reduzido por temperaturas noturnas de 10 °C ou menos. A ultraestrutura destas folhas e as análises químicas mostraram um elevado teor de amido nos cloroplastos no período luminoso e mantido a uma temperatura de 30 °C, sendo que esse amido desaparece após um período no escuro a 30 °C, mas continua presente, se a temperatura durante o período de escuro é de 10 °C. A inibição ou diminuição de amido dos cloroplastos parece representar redução da fotossíntese e do crescimento em baixa temperatura, fatos que os autores atribuem as enzimas sensíveis à temperatura, responsável por tornar solúvel o amido presente nos cloroplastos, fazendo com que o carbono fique indisponível para o crescimento da planta. Lionakis & Schwabe (1984) observaram menor acúmulo de massa seca da parte aérea em plantas de *Actinidia chinensis* cultivadas a 15 °C, similar ao observado para *A. strobilacea*. Contudo esses autores constataram que a temperatura de 20 °C foi a mais adequada para o acúmulo de massa em relação à temperatura de 25 °C, diferentemente do observado em *A. strobilacea*, onde não há diferenças significativas no conteúdo de massa seca das plantas cultivadas em 20 e 25 °C. As diferenças encontradas entre *A. chinensis* e *A. strobilacea* podem ser atribuídas ao fato de que *A. chinensis* é uma planta típica de clima temperado (Mattiuz & Fachinello 1996) e *A. strobilacea*, de clima tropical.

A figura 12 mostra os resultados do conteúdo de pigmentos fotossintéticos das plantas oriundas do desenvolvimento da gema lateral a partir de segmentos nodais mantidos a 15 °C, 20 °C e 25 °C, visto que a 10 °C não houve regeneração de plantas. Apesar das plantas cultivadas em 30 °C apresentarem maior alongamento do eixo caulinar, estas plantas apresentam aspecto esbranquiçado, o que refletiu o conteúdo de clorofilas, que se mostrou significativamente menor quando comparado com as plantas mantidas em 20 e 25 °C. Devido ao fato do conteúdo de carotenoides permanecerem significativamente menores quando comparadas com 20 e 25 °C, isso mostra que não houve resposta de adaptação da planta crescida a 30 °C, caracterizado pelo aumento de carotenoides de modo a evitar danos oxidativos por alta temperatura (Cui *et al.* 2006). O reduzido conteúdo de clorofila apresentado pelas plantas mantidas em 15 °C pode estar relacionado com atraso na gênese dos cloroplastos (Smillie *et al.* 1978). As respostas de alterações no conteúdo de pigmentos fotossintéticos são, comumente, observadas em plantas cultivadas em temperaturas não ideais

de cultivo (Cui *et al.* 2006, Wahid *et al.* 2007, Carvalho *et al.* 2013). Na bromélia *Nidularium minutum*, a redução de pigmentos foi acompanhado de uma redução do parênquima clorofiliano nas plantas cultivadas a 10 °C, quando comparadas com as plantas mantidas em 25 °C (Carvalho *et al.* 2013). A temperatura de 10 °C inibiu o acúmulo de pigmentos nos cloroplastos de mudas de *Coffea arabica*, que, por sua vez, alterou a captação de energia luminosa e transferência para o centro de reação do fotossistema II do tecido fotossintético desta espécie (Oliveira *et al.* 2009). Baixo conteúdo de pigmentos em baixa temperatura não está diretamente ligado ao bloqueio do mecanismo de síntese, mas, sim, da fotodestruição de clorofila antes da sua estabilização na estrutura de membrana das lamelas do cloroplasto (McWilliam & Naylor 1967). Assim, a redução da concentração de clorofila em folhas de algumas plantas pode ser um sintoma de estresse oxidativo (Aghaei *et al.* 2013).

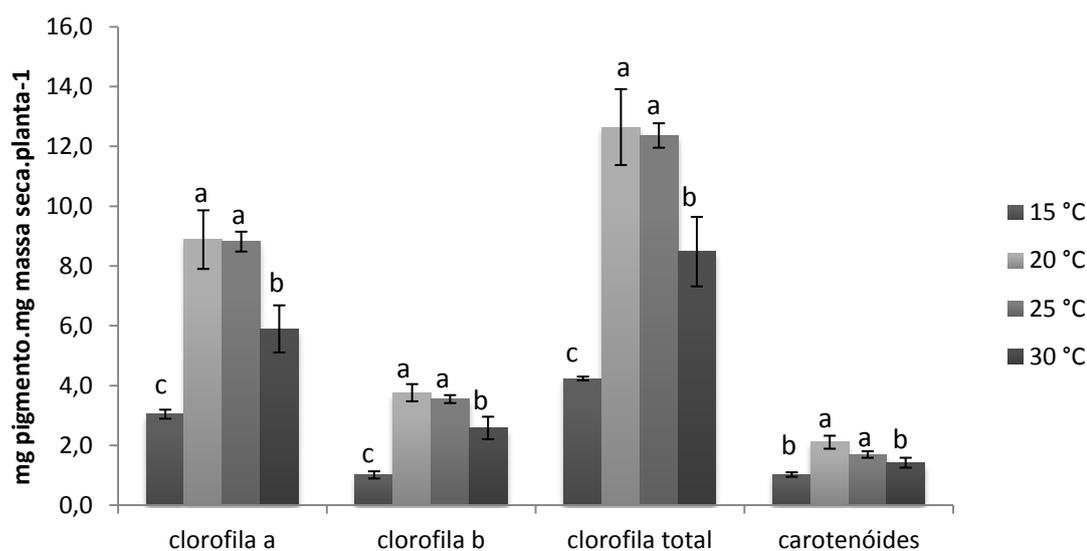


Figura 12 – Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plantas de *Acanthostachys strobilacea* obtidas de segmentos nodais cultivados em 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C por 90 dias *in vitro*. Clorofila a, Clorofila b, Carotenóides.

Os resultados do efeito da temperatura sobre o alongamento podem ser observados na figura 6. Quando mantidas nas menores temperaturas (15 e 20 °C), as plantas formaram rosetas normais (figuras 13B e C), sendo que os entrenós basais não apresentaram alongamento detectáveis. Em 25 °C, o caule das plantas apresentou um aumento no comprimento médio da região internodal de aproximadamente 1,0 cm e, apesar de maior

quantidade de nós observada nas plantas mantidas em 30 °C (figura 10), nessa condição térmica, as plantas apresentaram alterações morfológicas como coloração esbranquiçada (discutidas a seguir), fator que pode comprometer a sobrevivência da planta quando esta for transferida para condições *ex vitro*. As plantas apresentaram alongamento do eixo caulinar apenas quando mantidas em 25 °C e 30 °C, evidenciando os segmentos nodais. Em relação às plantas cultivadas a 30 °C, estas apresentaram o maior comprimento do eixo caulinar, contudo com aspecto clorótico e em alguns casos com sintomas de hiperhidricidade, o que será discutido posteriormente.

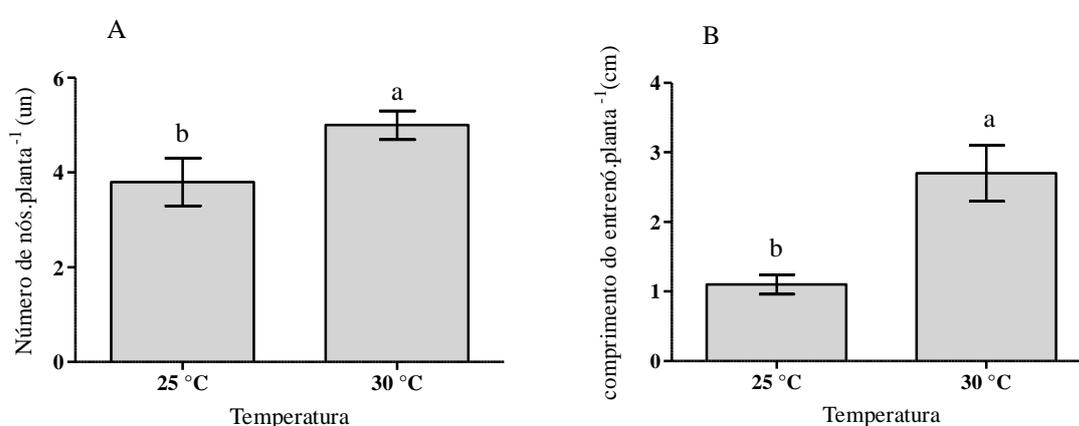


Figura 13 – Número de nós (A) e comprimento do entrenó (B) de plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* a partir de segmentos nodais observados em 25 e 30 °C.

Em relação à distância dos entrenós, Carvalho *et al.* (2002), estudando o crescimento e desenvolvimento de *Chrysanthemum* ‘Reagan Improved’, constataram que o comprimento final dos entrenós desta espécie ocorre em uma faixa de temperatura que varia de 16 a 28 °C. Faixa térmica maior quando comparada com *A. strobilacea*, que varia entre 25 e 30 °C. Essas diferenças podem estar relacionadas a fatores genéticos de adaptação da planta ao meio. Lionakis e Schwabe (1984), estudando o crescimento de *Actinidia chinensis* cultivadas *in vitro* em diferentes temperaturas e comprimento do dia, observaram que plantas cultivadas a 15 °C apresentaram menor alongamento do eixo caulinar e crescimento mais lento dos entrenós, quando comparadas às plantas cultivadas em 20 e 25 °C, durante um período de 150 dias.

Este aumento do comprimento dos entrenós facilita a quantificação dos nós presentes no caule curto de *A. strobilacea*. Os conhecimentos sobre alongamento caulinar são

provenientes de estudos referentes à transição da fase vegetativa para a reprodutiva de *Arabidopsis thaliana* (Obroucheva 2008); Matschi *et al.* 2013) ou alongamento rápido que ocorre em resposta ao sombreamento da copa ou submersão (Pierik *et al.* 2005, Stamm & Kumar 2010). A divisão celular fornece células para posterior alongamento e a expansão celular determina um rápido alongamento de vários órgãos e estabelece o padrão morfogênico da própria planta (Obroucheva 2008).

Plantas cultivadas em 15 e 20 °C não apresentaram alongamento do eixo caulinar. Esta morfologia foi observada apenas nas plantas mantidas em 25 °C e 30 °C, sendo que as plantas mantidas em 30 °C apresentaram número de nós e comprimento do entrenó significativamente maior quando comparados com as plantas mantidas em 25 °C (figura 13). O padrão de alongamento do caule depende do número e comprimento de entrenós. Número de entrenós e comprimento variou entre as plantas cultivadas sob diferentes regimes de temperatura. Em *Poinsettia*, o uso da temperatura mais alta durante o crescimento vegetativo, antes do início do desenvolvimento da flor, resulta em aumento no número de entrenós e altera substancialmente o padrão de alongamento de brotos laterais (Berghage & Heins 1991). Esses autores, inclusive, sugerem uma alteração na temperatura de cultivo, caso o produtor queira evitar o uso de reguladores de crescimento.

Outros trabalhos mostram os efeitos de temperaturas maiores sobre o alongamento do caule. A exposição de plantas de *Arabidopsis thaliana* a alta temperatura (28 °C) resulta em uma mudança dramática no seu desenvolvimento, incluindo um rápido alongamento do eixo caulinar da planta (Koini *et al.* 2009). Em seu estado reprodutivo, o padrão de alongamento do caule *Euphorbia pulcherrima* depende do número, comprimento e posição dos entrenós e varia entre as plantas cultivadas sob diferentes regimes de temperatura, sendo que entrenós mais longos podem ser obtidos aumentando-se a diferença entre a temperatura do dia e da noite (DIF), e entrenós mais curtos foram observados quando se diminuiu o DIF (Berghage & Heins 1991). Em algumas plantas, como o crisântemo (espécie de clima temperado), o tamanho do caule é controlado pela manipulação da temperatura (Carvalho *et al.* 2002). Estes autores verificaram um aumento do comprimento do entrenó nas plantas cultivadas em 22 °C, já quando essa mesma espécie foi mantida em 12 °C, o comprimento do entrenó foi significativamente menor. *A. strobilacea*, por ser uma espécie de clima tropical, teve o alongamento do seu caule a 25 °C, enquanto que em temperaturas inferiores, a planta reduziu seu crescimento e apresentou o caule curto envolto por bainhas foliares, morfologia

característica observada em Bromeliaceae (Benzing 1980). A inibição do alongamento caulinar de *A. strobilacea* por temperatura baixa é o contrário do observado para algumas plantas de clima temperado, como, por exemplo, a *Tulipa gesneriana*, que necessita de um tratamento com frio para alongamento do escapo floral (Rietveld *et al.* 2000). Vernalização de *Thlaspi arvense* L. resulta na alteração do metabolismo de giberelina (GA) de tal forma que a quantidade do precursor GA (ácido caurenóico) é bastante aumentada. Esta mudança induzida pelo frio no metabolismo da GA está restrita à região do meristema da parte aérea, local de percepção de frio nesta espécie (Hazebroek *et al.* 1993). A aplicação de giberelina após o tratamento com frio induz o rápido alongamento de plantas de *Raphanus sativus*, processo conhecido como “bolting”. Contudo ainda não se sabe se o tratamento frio afeta a sensibilidade ou a capacidade de resposta do caule para giberelina Nakayama *et al.* 1995. Embora diversos trabalhos revelem o papel do frio no alongamento do caule, seja na transição do estágio vegetativo para o reprodutivo, ou o rápido alongamento conhecido como “bolting”, esse conhecimento se restringe às espécies de clima temperado.

As avaliações anatômicas mostraram que o maior alongamento observado em *A. strobilacea* mantidas em 30 °C é decorrência de um alongamento celular e não no aumento no número de células. As plantas cultivadas em 15 e 20 °C apresentaram células recém-divididas com uma fina parede entre elas. O mesmo não foi observado nas plantas de 25 e 30 °C, justamente as que apresentaram alongamento do eixo caulinar (figura 14). Em plantas superiores, o estresse térmico altera significativamente a divisão e taxas de alongamento celular (Scandalios *et al.* 1990). No desenvolvimento do girassol, o crescimento do caule consiste em uma interação entre a divisão celular e posterior expansão da célula pela deformação plástica da parede celular, associada com a manutenção do turgor através de um catabolismo bem regulado, sendo que o hipocótilo dessa espécie foi significativamente maior quando a temperatura de cultivo aumentou em intervalos de 5 °C (de 10 a 25 °C) (Kutschera & Niklas 2013).

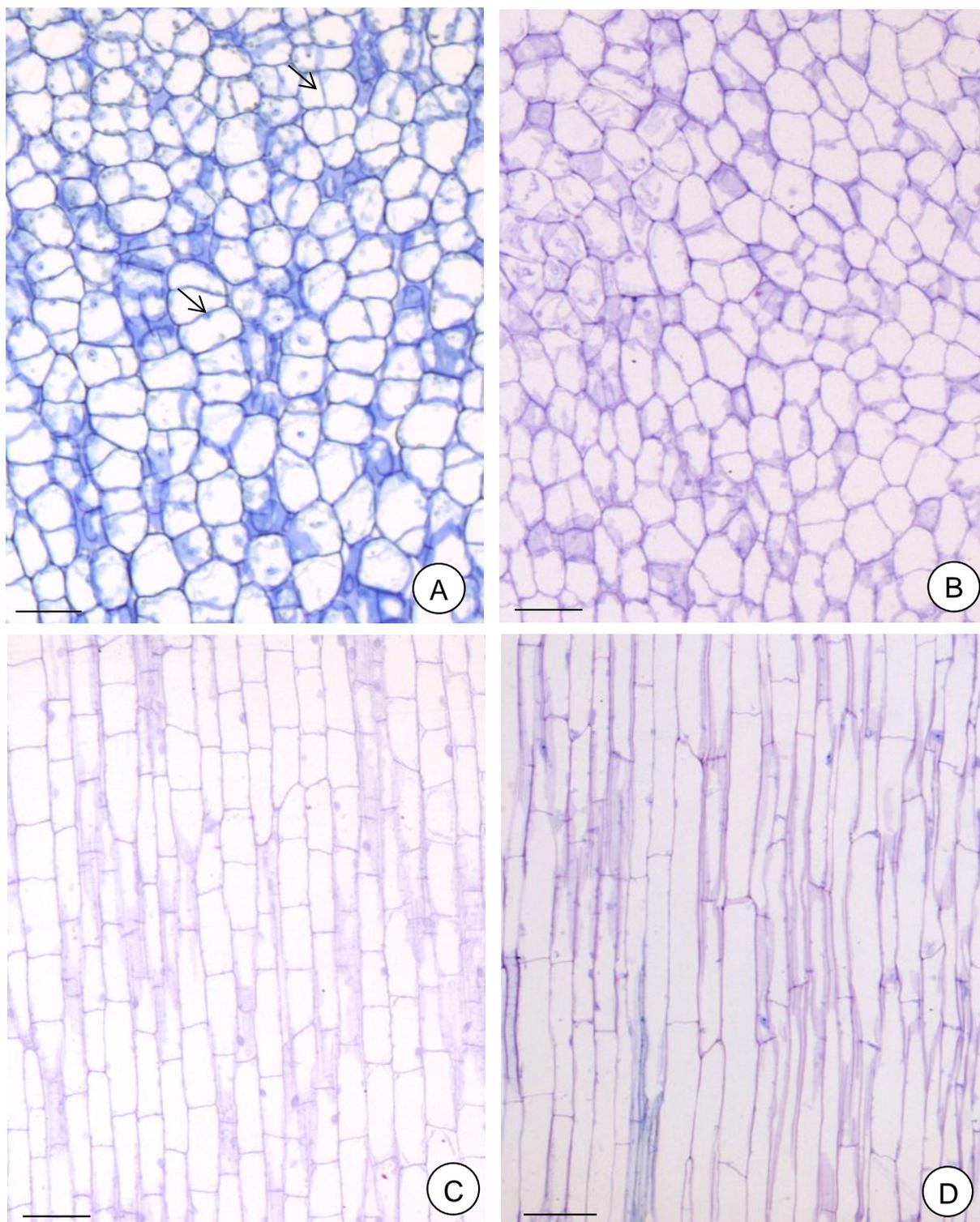


Figura 14. Secções longitudinais do entrenó de *Acanthostachys strobilacea*. Divisões celulares são observadas em plantas crescidas a 15 e 20 °C (A-B). Já o alongamento celular ocorreu naquelas mantidas a 25 e 30 °C (C-D). Observe as células recém-divididas com uma parede celular fina (setas) entre si. Barras = 100 µm.

A temperatura também influencia no tamanho médio das células das folhas de cevada, pois quando estas são mantidas em 5°C, as células são menores em relação às células das plantas mantidas em 20 °C (Harrison *et al.* 1998). Além disso, na base da folha, onde a atividade mitótica é maior, a redução na temperatura diminui o tempo de duplicação das células, levando a uma redução no crescimento em extensão celular como resposta ao frio. Nesse caso, as plantas de cevada são capazes de gerar uma reserva de células divididas, mas não expandidas, ou seja, essas plantas são capazes de desviar os recursos do crescimento em extensão para divisão celular, e acumular células, de modo que haja uma expansão posterior no momento em que houver um reaquecimento (Harrison *et al.* 1998). O alongamento celular pode ser um efeito do ácido giberélico, haja vista que GA promove a orientação transversal dos microtúbulos em células alongadas (Sun & Gubler 2004).

A redução do crescimento pode ser atribuída a diversos fatores. Um deles está relacionado com a diminuição da pressão de turgor celular, pois as pressões positivas de turgescência da água deve sempre mover-se de uma célula para outra em crescimento (Lockhart 1965, Kutschera & Niklas 2013). O crescimento de uma única célula do entrenó da alga *Chara coralina* ocorre com o aumento da pressão de turgor e, quando há redução da temperatura, as propriedades elásticas da célula não são afetadas, mas o crescimento é inibido, o que foi atribuído ao efeito da temperatura sobre o potencial osmótico da célula, sendo que, quando a pressão de turgescência estava acima do normal o crescimento foi, em parte, reestabelecido em temperatura baixa (Proseus *et al.* 2000). Outro fator relacionado à redução do crescimento em plantas de clima temperado envolve a expressão constitutiva do gene CBF1, que confere tolerância ao congelamento regulando a expressão de genes envolvidos na transcrição e síntese de osmólitos, no mecanismo de desintoxicação de espécies reativas de oxigênio, transporte de membrana, metabolismo e sinalização hormonal e muitas outras respostas com funções protetoras celulares conhecidas ou presumíveis de atraso no crescimento. Além disso, a indução da expressão deste gene pela baixa temperatura também está relacionada, pelo menos em parte, ao acúmulo de DELLAS, uma família de proteínas repressoras de crescimento, cuja degradação é estimulada por giberelina (GA) (Achard *et al.* 2008). Os resultados de temperatura e GA serão apresentados no item seguinte.

Alterações na temperatura, tanto alta como baixa, são percebidas e então traduzidas para o núcleo onde o transcriptoma é alterado, tratando-se de um parâmetro físico que influencia estruturas moleculares (proteína, DNA) ou supramoleculares (membranas,

cromossomas), através de efeitos termodinâmicos simples. Esses diferentes eventos de detecção de mudança na temperatura podem desencadear eventos de sinalização, perturbando a interação harmoniosa de diferentes enzimas dos diversos ciclos metabólicos, cascatas de fosforilação, aumento na concentração de cálcio e cadeias redox, que resultam em alteração na expressão gênica. Em consequência, pools de certos metabólitos intermediários podem aumentar, enquanto outros podem diminuir, levando a respostas que conduzam a um novo equilíbrio celular (Ruelland & Zachowski 2010).

De acordo com a figura 2, as plantas cultivadas em 15 e 20 °C não apresentam alongamento do eixo caulinar. Tendo em vista que a aplicação de ácido giberélico pode induzir o alongamento caulinar para algumas espécies, os experimentos de adição desse fitorregulador visaram mostrar se a inibição do alongamento nessas temperaturas poderia ser revertida pela aplicação de GA. A resposta está associada aos resultados descritos a seguir. Dados da literatura mostram haver interações importantes entre o ácido giberélico e temperatura (Farrel *et al.* 2006; Achard *et al.* 2008).

## 6.2 Avaliação da influência do Ácido Giberélico

Os testes com ácido giberélico foram realizados com duas metodologias diferentes. Na primeira, o ácido giberélico foi adicionado no meio nutritivo antes do mesmo ser submetido ao processo de esterilização em autoclave, conforme descrito no item 5.4.1. Contudo, as respostas obtidas foram, para a maior parte dos parâmetros, inibitório, partindo do pressuposto de que o ácido giberélico poderia ter sido degradado com a alta temperatura a que foi submetido durante a esterilização. A segunda consistiu em esterilizar, primeiramente, o meio de cultura e na capela de fluxo laminar. O ácido giberélico foi ultrafiltrado (item 5.4.2), eliminando o risco de degradação que poderia ter ocorrido no primeiro teste.

As plantas cultivadas com variações nas concentrações de ácido giberélico em diferentes temperaturas tiveram as mesmas respostas morfológicas que as plantas do experimento controle (cultivo dos segmentos nodais em diferentes temperaturas sem a adição de fitorregulador no meio), em relação à redução do crescimento em baixa temperatura e alongamento caulinar a 25 e 30 °C. No entanto, algumas diferenças morfológicas entre as plantas cultivadas com GA<sub>3</sub> e o controle foram constatadas, como pode ser observado na figura 15.

### 6.2.1 Ácido giberélico submetido à autoclave

O crescimento de plantas obtidas a partir de segmentos nodais isolados cultivados *in vitro* em meio de cultura de Murashige & Skoog (1962), reduzido a um quinto da concentração original dos macronutrientes, acrescentado de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA) (0,5; 1,0 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup>), foi acompanhado após 3 meses de cultivo nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C.

A presença do ácido giberélico inibiu o número de folhas e estimulou o aumento no comprimento das mesmas em plantas cultivadas *in vitro*, sob temperatura constante de 30 °C. Efeito inibitório foi observado também no comprimento foliar na presença de 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de ácido giberélico no meio de cultura das plantas mantidas em 20 e 25 °C. Este fitorregulador não alterou o número e o comprimento das folhas das plantas cultivadas *in vitro* em 15 °C. O efeito inibitório do GA<sub>3</sub> pode estar relacionado a dois fatores. O primeiro refere-se ao próprio catabolismo do fitorregulador, onde níveis de transcrição de alguns dos genes GA20ox e GA3ox relacionados à etapa de síntese de giberelina ativa são reprimidos, enquanto genes GA2ox relacionados a degradação são estimulados devido ao tratamento com GA (Fleet & Sun 2005). O segundo fator refere-se à possível produção de algum composto inibitório devido ao calor do processo de esterilização em autoclave, que poderia agir inibindo alguns aspectos da morfogênese da planta. Esse aspecto do tratamento de plantas por GA<sub>3</sub> foi proposto por Hodson & Hamnu (1971), após a constatação de que giberelinas em baixas concentrações não inibem florescimento, contudo, meio de cultura contendo giberelina submetido à esterilização em autoclave inibe a floração de *Lemna perpusilla* na presença de 2 mg.l<sup>-1</sup>.

Este efeito inibitório não foi observado nas folhas das plantas mantidas em 15, 20 e 25 °C. Albim *et al.* (2008) observaram que as folhas da bromélia *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae) apresentam um maior comprimento quando cultivadas *in vitro* a 25 °C, contudo as folhas possuem um aspecto clorótico e ocorre menor porcentagem de estabelecimento das gemas, de forma que esses autores dispensam o uso de 4,5 mg.l<sup>-1</sup> ácido giberélico na propagação desta espécie.

A atividade do ácido giberélico diminuiu, quando plantas de *Medicago sativa* foram cultivadas em dias curtos e frios (Rikin *et al.* 1975). Esses autores afirmam ainda que há uma redução da atividade do ácido giberélico durante a exposição de plantas herbáceas e lenhosas em baixa temperatura. Stavang *et al.* (2005) estudaram a influência de diferentes combinações

de temperaturas diurnas e noturnas sobre os níveis de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e da temperatura constante na expressão de genes envolvidos na biossíntese e repressão de GA, associando com alongamento diurno da ervilha (*Pisum sativum* L. cv Torsdag). Os autores constataram que temperatura baixa durante o período diurno (13 °C dia e 21 °C noite) reduziu o tamanho do entrenó quando comparada com plantas crescidas em temperatura constante durante o dia e a noite (17 °C dia e 17 °C noite) e com plantas cultivadas em temperatura maior durante o período diurno (21 °C dia e 13 °C noite), porém essa redução do entrenó não afetou o desenvolvimento da planta.

Em plântulas de centeio de inverno (*Secale cereale* L. cv Mosqueteiro) e espinafre (*Spinacia oleracea* L. cv Savoy), o efeito mais visível da alta temperatura de cultivo foi um aumento acentuado no comprimento do hipocótilo e pecíolo em plantas cultivadas na luz. Os hipocótilos de plântulas cultivadas a 29 °C foram de 4 a 5 vezes maiores do que os hipocótilos de plântulas cultivadas 20 °C (Gray *et al.* 1998). A alta temperatura também induz um rápido alongamento do eixo caulinar nas plantas de alface, um fenômeno conhecido como *bolting*. Nesse caso, a expressão de LsGA3ox1 (gene relacionado a biossíntese de giberelina) sob temperaturas mais elevadas, foi cerca de 10 vezes maior do que em temperaturas mais baixas, LsGA3ox1 codifica a enzima responsável pela conversão de GA<sub>20</sub> a GA<sub>1</sub>, forma ativa de giberelina (Fukuda *et al.* 2009).

Com relação ao sistema radicular, o ácido giberélico inibiu o aumento no número de raiz em todas as temperaturas, com exceção das plantas mantidas em 15 °C, onde a presença de 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> no meio nutritivo fez com que estas apresentassem uma média de uma raiz por planta, durante os 3 meses de cultivo. O ácido giberélico presente no meio de cultura estimula a formação de uma zona meristemática radicular ou ainda pode desencadear o desenvolvimento de uma zona radicular existente (Kochba *et al.* 1974). Porém, quando aplicado em concentrações elevadas, impede a formação de raízes em algumas espécies (Albim *et al.* 2005; Fráguas *et al.* 2003).

O comprimento radicular das plantas de *A. strobilacea* obtidas de segmento nodal cultivado *in vitro* foi estimulado na presença de 0,5 e 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de ácido giberélico no meio de cultura das plantas, independente da temperatura em que foram mantidas (Figura 15 F) . Na maior concentração testada neste trabalho (1,5 mg.l<sup>-1</sup>), o efeito do ácido giberélico sobre o comprimento da raiz de *A. strobilacea* foi inibitório, quando as plantas foram mantidas em 20, 25 e 30 °C em relação às plantas cultivadas em meio sem o fitorregulador. Assim como o

número de folhas, o acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea das plantas cultivadas em meio nutritivo com diferentes concentrações de ácido giberélico foi inibido pela presença deste.

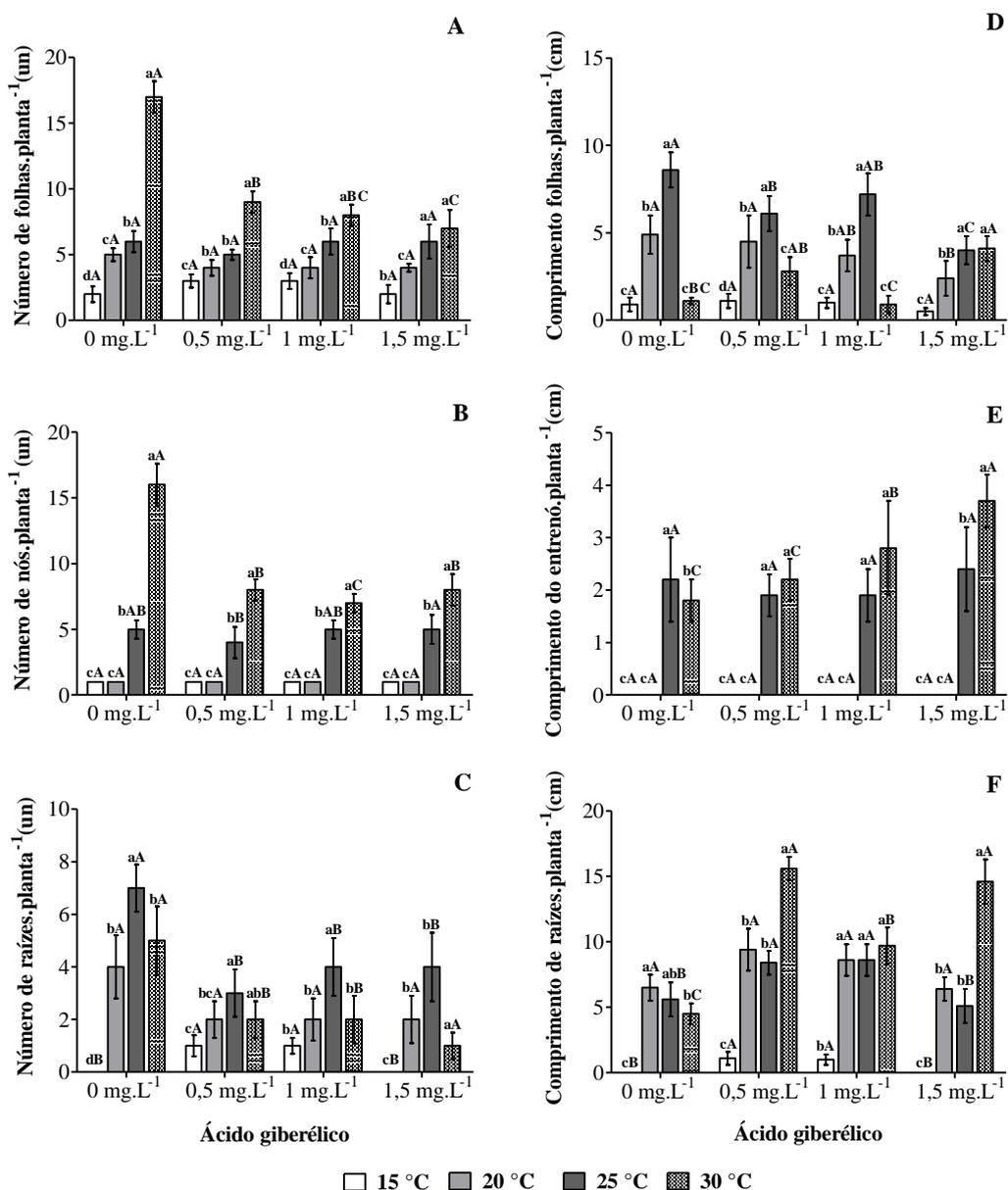


Figura 15 – Número de folhas (A), comprimento médio da maior folha (B), número de nós (C), comprimento do entrenó (D), número de raízes (E) e comprimento médio da maior raiz (F) de plantas de *A. strobilacea* provenientes do cultivo *in vitro*, a partir de segmentos nodais mantidos a 15, 20, 25, e 30 °C em meio nutritivo MS/5 adicionados ou não de 0,5; 1,0 e 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de ácido giberélico. Letras minúsculas na vertical indicam diferenças entre as

temperaturas, dentro de cada parâmetro e letras maiúsculas na horizontal indicam diferenças entre as concentrações de ácido giberélico, entre os parâmetros segundo teste de Tukey com nível de significância a 5%. Os valores representam a média composta de plantas (n=25).

Para *A. strobilacea*, podemos inferir que o ácido giberélico, quando submetido à autoclave, exerceu efeito inibitório em alguns parâmetros biométricos (figura 15) e efeito promotor do alongamento celular das folhas, quando as plantas são cultivadas em 30 °C (figura 15), porém não há atividade deste fitorregulador sobre as folhas quando as plantas são mantidas em 15 °C. Plantas mantidas nesta temperatura apresentam um crescimento mais lento quando comparadas com as plantas mantidas nas demais temperaturas, mesmo na presença do fitorregulador, que é conhecido por seu efeito no alongamento do eixo caulinar. Níveis endógenos de GA diminuem à medida que a temperatura é reduzida e isso está associado à diminuição do crescimento da parte aérea em *Daucus carota*, *Triticum aestivum*, *Campanula isophylla*, *Dendranthema grandiflorum* e *Helianthus annuus* (Kurepin *et al.* 2011).

Com relação ao alongamento caulinar das plantas a 25 °C, a presença de ácido giberélico no meio nutritivo inibiu o aumento no número de segmentos nodais do caule, sendo que, na presença do fitorregulador, as plantas apresentaram menor número de nós ao longo do eixo caulinar quando comparadas com as plantas mantidas em meio sem o fitorregulador e cultivadas em 30 °C. Contudo, na presença de 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de ácido giberélico, houve um aumento no comprimento do entrenó das plantas mantidas em 30 °C com relação às plantas cultivada sem o fitorregulador, abaixo desta temperatura, não há diferença no número de nós e no comprimento da distância entre eles (Figura 15).

O comprimento do eixo caulinar observado em 25 °C parece não ser efeito do ácido giberélico, uma vez que não apresentaram diferenças significativas com as plantas cultivadas em 15 e 20 °C. Em plantas de *Brassica napus* cultivadas *in vitro* sob 23 °C, Gao *et al.* (2010) observaram que a concentração de 1µM de ácido giberélico causou um aumento significativo no alongamento do hipocótilo. No entanto, quando a concentração de GA<sub>3</sub> ultrapassou esse valor, o comprimento do hipocótilo foi significativamente mais curto do que o controle. No entanto, o efeito promotor do crescimento da parte aérea pode variar de acordo com a espécie. Villa *et al.* (2008) constataram que 8 mg.l<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> promoveram um aumento no comprimento da parte aérea da amoreira-preta, cultivar Ébano, cultivadas *in vitro* a partir de

segmentos nodais por 60 dias em sala de crescimento a  $27 \pm 1$  °C, diferentemente do obtido neste estudo com *A. strobilacea*.

Efeito inibitório foi observado também para o acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea das plantas de *A. strobilacea* mantidas sob 25 e 30 °C, e para a massa seca da raiz das plantas mantidas em 20 °C na concentração de 1,5 mg.l<sup>-1</sup> (figura 16). O ácido giberélico apresentou um efeito promotor no conteúdo de massa fresca e seca da raiz das plantas cultivadas em 15 °C, e massa fresca e seca da parte aérea das plantas mantidas em 20 °C. Não foi observado efeito do ácido giberélico no conteúdo de massa fresca e seca da raiz das plantas cultivadas em 25 e 30 °C, massa fresca e seca da parte aérea das plantas mantidas em 15 °C, e na massa seca da raiz das plantas obtidas de 15 °C. A avaliação do conteúdo de massa fresca mostrou que as plantas mantidas a 15 °C não apresentaram diferenças significativas na parte aérea e raiz em relação às plantas cultivadas em meio com diferentes concentrações de ácido giberélico e sem giberelina. Sob temperatura de 20 °C, plantas obtidas no meio contendo 1,0 mg.L<sup>-1</sup> do fitorregulador apresentaram massa fresca da parte aérea significativamente maior em relação às plantas cultivadas sem giberelina. Quando mantidas em 25 e 30 °C, as plantas apresentaram conteúdo de massa fresca da parte aérea significativamente menor em relação às plantas cultivadas *in vitro* sem giberelina no meio nutritivo, e não houve diferença em relação à massa fresca do sistema radicular.

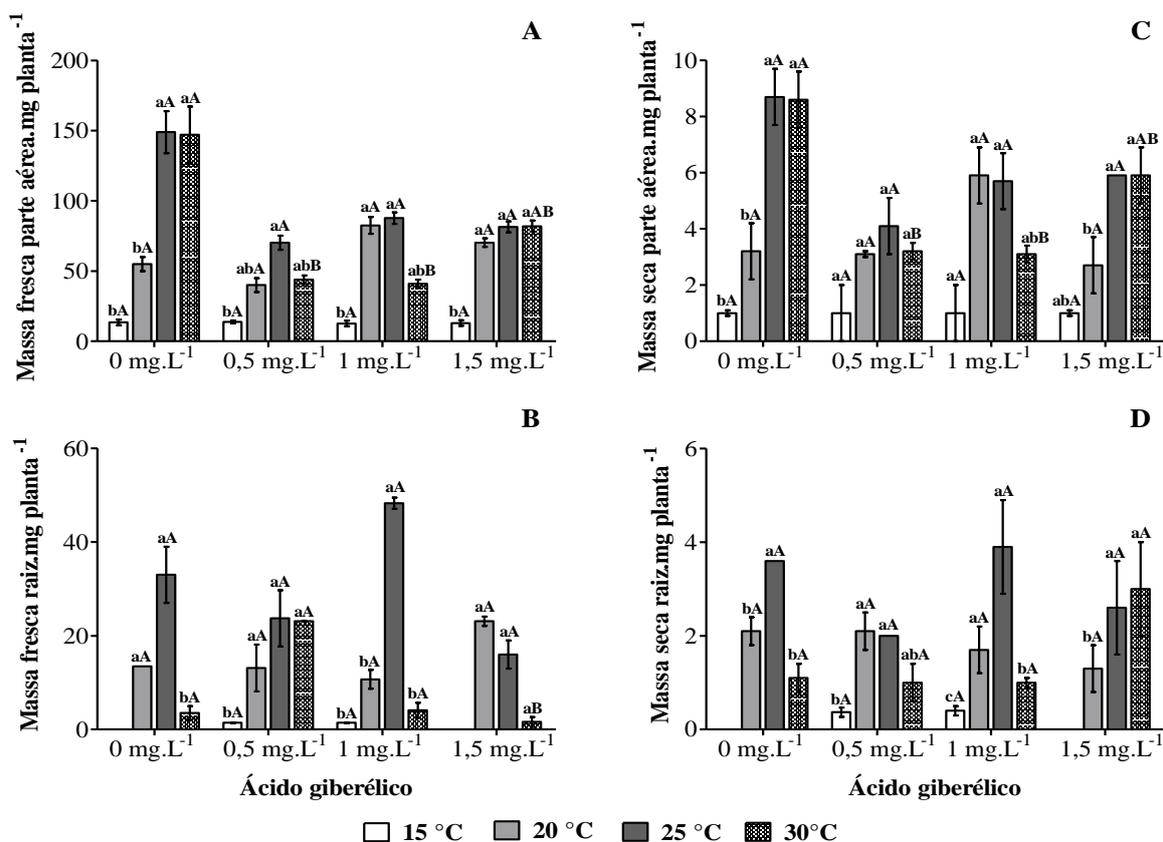


Figura 16 – Massa fresca da parte aérea (A), massa seca da raiz (C), massa fresca da raiz (B) e massa seca da raiz (D) de plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio contendo 0,5; 1,0 e 1,5 mg.l<sup>-1</sup> e meio MS sem o fitorregulador em 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C. Letras minúsculas na indicam diferenças entre as temperaturas, dentro de cada tratamento e letras maiúsculas na indicam diferenças entre as concentrações de ácido giberélico, segundo teste de Tukey com nível de significância a 5%. Os valores representam a média composta de plantas (n=25).

Sansberro *et al.*(2001), estudando as respostas morfogênicas de segmentos nodais de erva-mate cultivados *in vitro* e tratados com diferentes giberelinas, constataram que a adição de GA<sub>3</sub> no meio de cultura inibiu o comprimento dos brotos que apresentaram 5 mm ou mais de tamanho. Tem sido demonstrado para *Arabidopsis thaliana* que a aplicação massiva de ácido giberélico no meio de cultura pode desencadear a conjugação deste fitorregulador com o açúcar adicionado no meio nutritivo, além de ter um feedback inibitório na atividade da C20 oxidase (Xu *et al.* 1999), enzima chave na biossíntese de giberelinas que catalisa a conversão de GA53 a GA20 em uma das etapas finais para produção de giberelina ativa (Olszewski *et al.* 2002). O conteúdo de giberelina é regulado por uma família de proteínas nucleares repressoras do crescimento chamada DELLAS, que, por sua vez, são componentes do C-

repeat binding factor 1 (CBF1) induzido em resposta ao estresse (Achard *et al.* 2008). Isso pode explicar a baixa estatura apresentada por plantas adaptadas ao clima frio (Janská *et al.* 2010). Muitas espécies de plantas de regiões temperadas podem adquirir tolerância à temperatura de congelamento por meio de uma exposição temporária a temperaturas baixas acima de 0 °C. Os genes *COR* (cold responsive) são expressos em plantas expostas a baixas temperaturas, onde tem sua expressão controlada por CBFs, entre outros (Chinnusamy *et al.* 2004). CBF1 pode estimular a expressão do gene da GA-2-oxidase, o qual codifica uma enzima que reduz os níveis de giberelina bioativas, levando à estabilização de proteínas DELLA, de modo que plantas mutantes que super expressam CBF1 são anãs e apresentam redução do crescimento (Gao *et al.* 2011).

A figura 17 mostra o aspecto morfológico das plantas cultivadas nas diferentes temperaturas em meio nutritivo sem fitorregulador e contendo 0,5; 1,0 e 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de ácido giberélico submetido a esterilização em autoclave por 15 min.

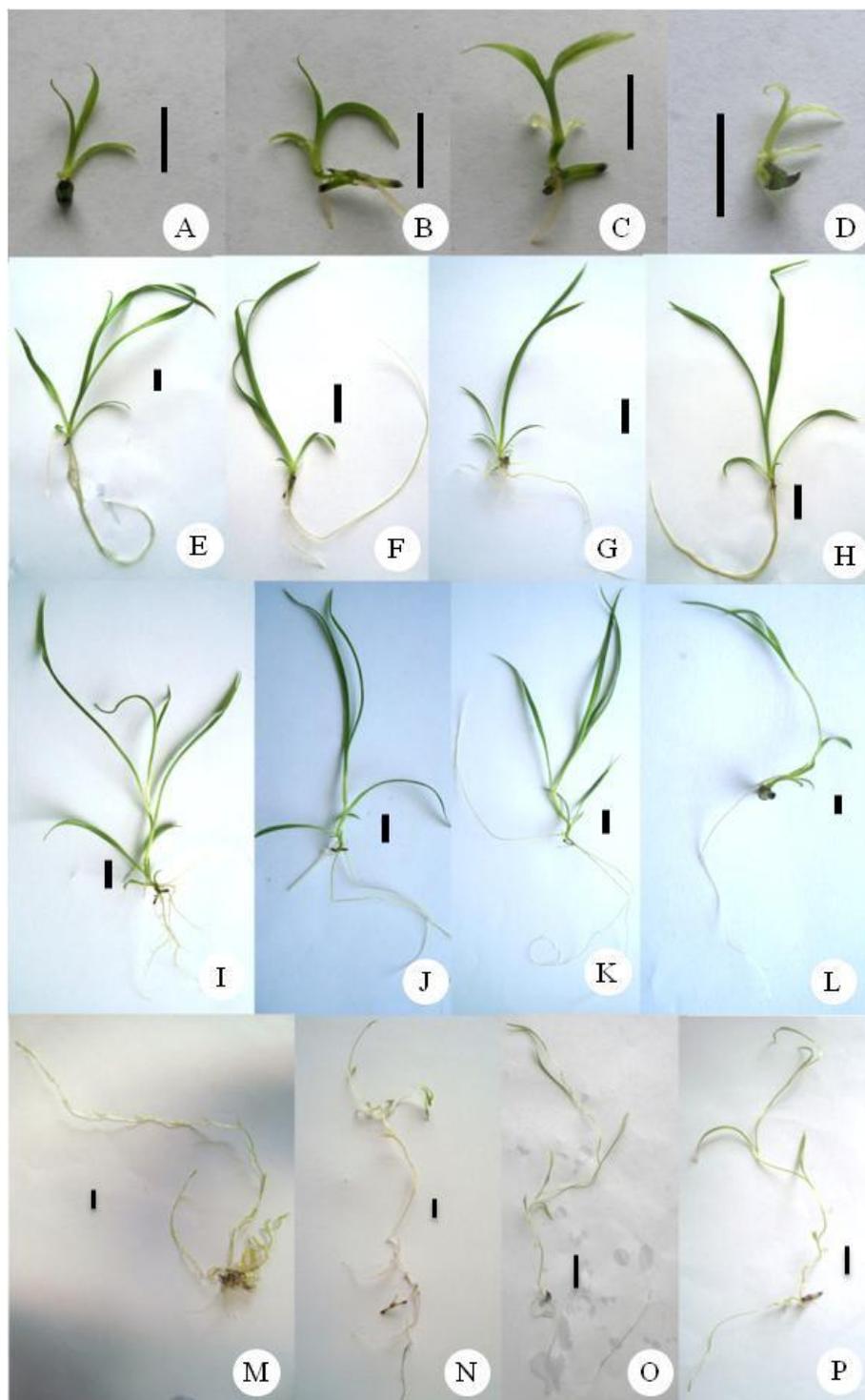


Figura 17 – Plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* a partir de segmentos nodais em 15 °C (A-D), em meio sem GA<sub>3</sub> (A), com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (B), com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (C) e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (D); 20 °C (E-H), em meio sem GA<sub>3</sub> (E), com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (F), com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (G) e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (H); 25 °C (I-L), em meio sem GA<sub>3</sub> (I), com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (J), com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (K) e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (L) e 30 °C (M-P), em meio sem GA<sub>3</sub> (M), com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (N), com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (O) e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (P). Barra = 1cm.

### 6.2.2 Ácido Giberélico ultrafiltrado

O crescimento de plantas obtidas a partir de segmentos nodais isolados cultivados *in vitro* em meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) reduzido a um quinto da concentração original dos macronutrientes acrescentado de diferentes concentrações de ácido giberélico ultrafiltrado (5 e 50  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>) e paclobutrazol (5 e 50  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>) foi acompanhado após 3 meses de cultivo nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C.

A análise de componentes principais mostrou que as principais tendências de variação dos parâmetros biométricos avaliados das plantas nas diferentes temperaturas e concentração de ácido giberélico podem ser visualizadas pela análise de componentes principais (PCA), que resumiu 83 % da variabilidade conjunta dos dados nos dois primeiros eixos (figura 18). O eixo 1 de ordenação (65 % de variabilidade) apresenta a separação das unidades amostrais nas temperaturas de 15° C e 25° C, onde as ordenou completamente. Do lado direito do eixo 1, foram ordenadas as observações das plantas de 15° C, independente da concentração de ácido giberélico presente no meio de cultura, sendo que as plantas cultivadas em meio nutritivo sem ácido giberélico e com 5  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico estão mais relacionadas entre si e com o comprimento foliar do que com as plantas cultivadas em meio contendo 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico. De forma inversa, no lado esquerdo do eixo, ordenam-se as plantas mantidas em 25 °C. As unidades amostrais das plantas mantidas nessa condição térmica estão mais relacionadas aos parâmetros avaliados do que as plantas dos demais tratamentos térmicos. Além disso, plantas cultivadas em meio contendo 5  $\mu\text{M}$  do fitorregulador associaram-se entre si e com as plantas cultivadas em meio sem o fitorregulador. Plantas cultivadas em meio nutritivo contendo 5  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico estão heterogeneamente distribuídas no eixo, onde se relacionam principalmente quanto ao número de folhas, comprimento radicular e número de nós. Já as plantas cultivadas em meio sem o fitorregulador aproximam-se dos vetores relacionados aos parâmetros número e comprimento de folhas e raízes. As unidades amostrais das plantas mantidas em meio contendo 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico estão distribuídas ao longo dos vetores referentes aos números de folhas e nó, além do comprimento do internó. Esses dados revelam que em 25 °C a presença de 50  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub> no meio nutritivo está mais relacionada à produção quantitativa de folhas e nós do que as demais condições térmicas; e na ausência do fitorregulador, o número de folhas e raízes e seus respectivos comprimentos são favorecidos quando as plantas são mantidas em 25 °C.

O eixo 2 (18% de variabilidade) separou as unidades amostrais das plantas mantidas em 20 °C. Em seu lado positivo, concentram-se unidades amostrais desta condição térmica cultivadas em meio contendo 5 uM de ácido giberélico, próxima ao eixo do comprimento do entrenó, indicando que, nessa condição, as plantas apresentam um alongamento do entrenó, quando comparado com os demais tratamentos. Essas unidades amostrais das plantas em 20°C se relacionam com aquelas das plantas cultivadas em 25 °C na presença de 5 e 50 uM de ácido giberélico no meio nutritivo. Dessa forma, a maior variabilidade do conjunto de dados foi explicada pela temperatura (eixo 1 e 2). As plantas mantidas em 15 °C estão menos relacionadas com os parâmetros biométricos avaliados em relação às plantas mantidas nas demais condições térmicas, independente da concentração do fitorregulador testada, indicando que, em baixa temperatura, não há favorecimento no desenvolvimento da planta de acordo com os parâmetros avaliados. As plantas mantidas em 20 °C estão mais relacionadas com estes parâmetros quando comparados com as plantas de 15 °C, porém menos relacionados quando comparadas com as plantas mantidas 25 °C. Estes resultados mostram que a temperatura de 25 °C, independente da concentração do fitorregulador, favorece o desenvolvimento das plantas segundo os parâmetros biométricos avaliados.

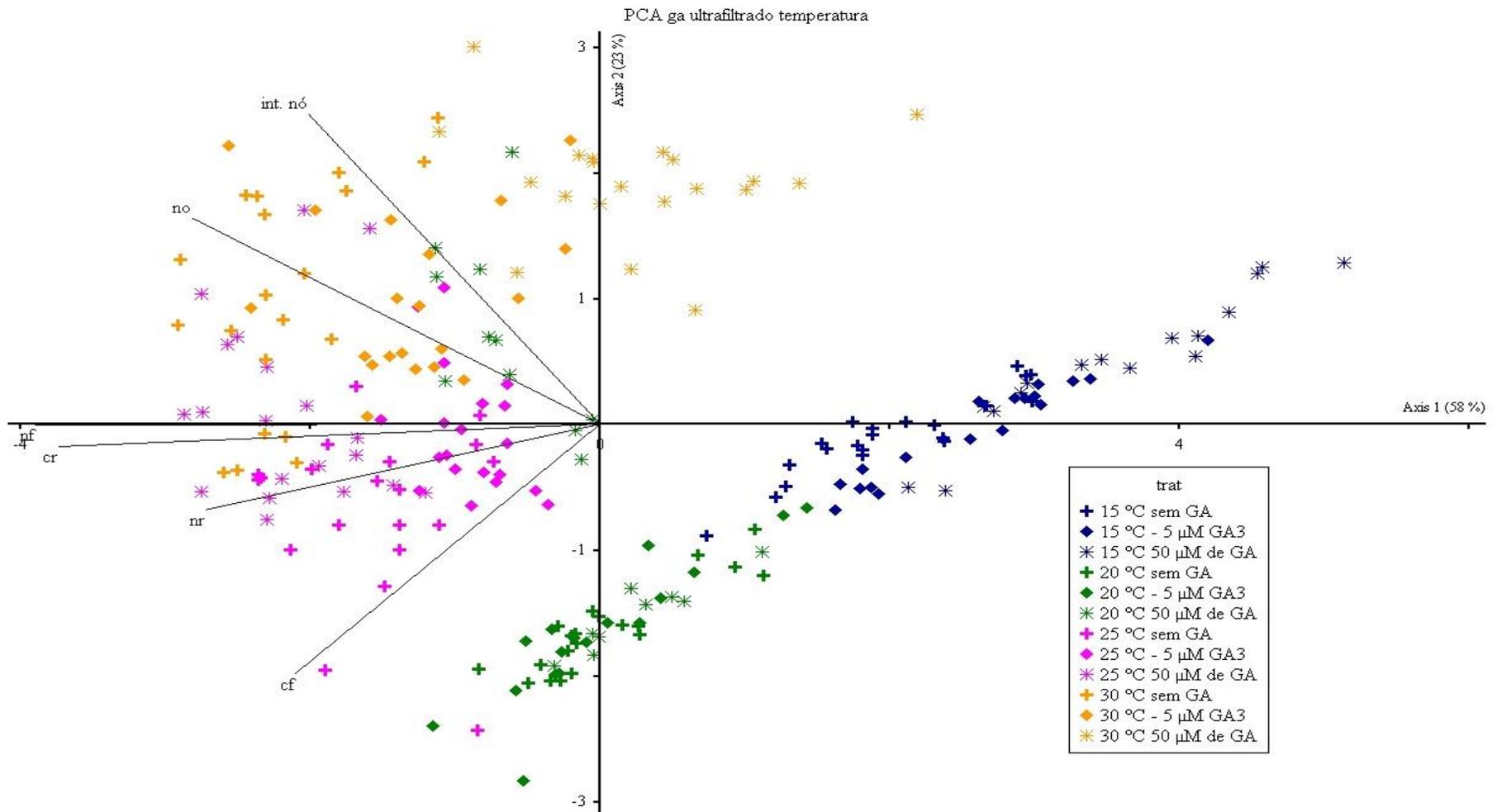


Figura 18 – Ordenação (PCA) dos parâmetros avaliados das plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* em 15, 20, 25 e 30 °C, em meio nutritivo contendo de ácido giberélico ultrafiltrado (5 e 50 μM GA<sub>3</sub>) por 3 meses.

Todos os resultados ilustrados até agora mostraram um forte efeito da temperatura baixa na manutenção da morfologia em roseta da bromélia *A. strobilacea*. Os testes realizados com o ácido giberélico tinham por finalidade sobrepor o forte efeito da temperatura baixa observada até então; e os testes com ácido giberélico ultrafiltrado mostraram que é possível alongar o eixo caulinar das plantas cultivadas em 20 °C, quando adicionado 50 µM de ácido giberélico ultrafiltrado no meio nutritivo. Contudo esse efeito somente foi possível nessa temperatura e com o uso dessa concentração mais elevada, mostrando que depende da faixa térmica e da quantidade de GA<sub>3</sub> disponível para os tecidos. Em alguns casos, o tratamento frio induz a expressão dos genes de biossíntese de GA, AtGA3ox1 e AtGA20ox2, consistente com estes resultados, os níveis de giberelinas bioativas são significativamente aumentado por tratamento com frio. Assim, GA<sub>1</sub> atua como mediador da resposta termoperiódicas (Yamaguchi 2008).

As plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* sob 15 °C em meio nutritivo com diferentes concentrações de ácido giberélico ultrafiltrado (Figura 19) apresentaram um menor número de folhas em função da concentração do fitorregulador presente no meio de cultura – quanto maior a concentração, menor o número de folhas produzidas pela planta –, sugerindo um efeito inibitório de ácido giberélico sobre o número de folhas nesta condição térmica. Contudo, o comprimento foliar foi maior quando 5 µM foi adicionado ao meio em relação as demais condições de crescimento. O efeito inibitório deste fitorregulador também foi observado no número e no comprimento radicular, sendo este último menor, quando as plantas foram mantidas em meio com maior concentração. O número de segmentos nodais não foi afetado pelo fitorregulador. Assim sendo, o ácido giberélico não foi capaz de induzir o fenótipo alongado nas plantas cultivadas em 15 °C. Pode-se inferir que, além das plantas não responderem ao suprimento externo de ácido giberélico, outro fator endógeno pode estar inibindo a ação da giberelina endógena, resultando na redução do crescimento da planta.

A presença de ácido giberélico no meio de cultura das plantas cultivada em 25 °C não influenciou o crescimento da parte aérea, pois o número e o tamanho das folhas, bem como o número de nós evidentes e a distância entre eles não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com as plantas cultivadas em meio de cultura sem ácido giberélico. Adição de ácido giberélico no meio de cultura reduziu o número de raízes com relação às plantas controle, enquanto que a maior concentração (50 µM de ácido giberélico) induziu maior comprimento deste órgão.

Os segmentos de plantas de *Avena sativa* cultivadas em 30 °C responderam mais ao GA<sub>3</sub>, enquanto que sob 20 °C e 10 °C os segmentos responderam menos (Jusaitis *et al.* 1981). George *et al.* (2007) relataram que a biossíntese de giberelinas pode ser promovida por meio do tratamento a frio do material da planta, e, como exemplo, citam que para a formação do bulbo de tulipa a partir do cultivo de broto há necessidade de tratamento com frio, e este pode ser substituído por imersão do broto em 1,0 mg.l<sup>-1</sup>.

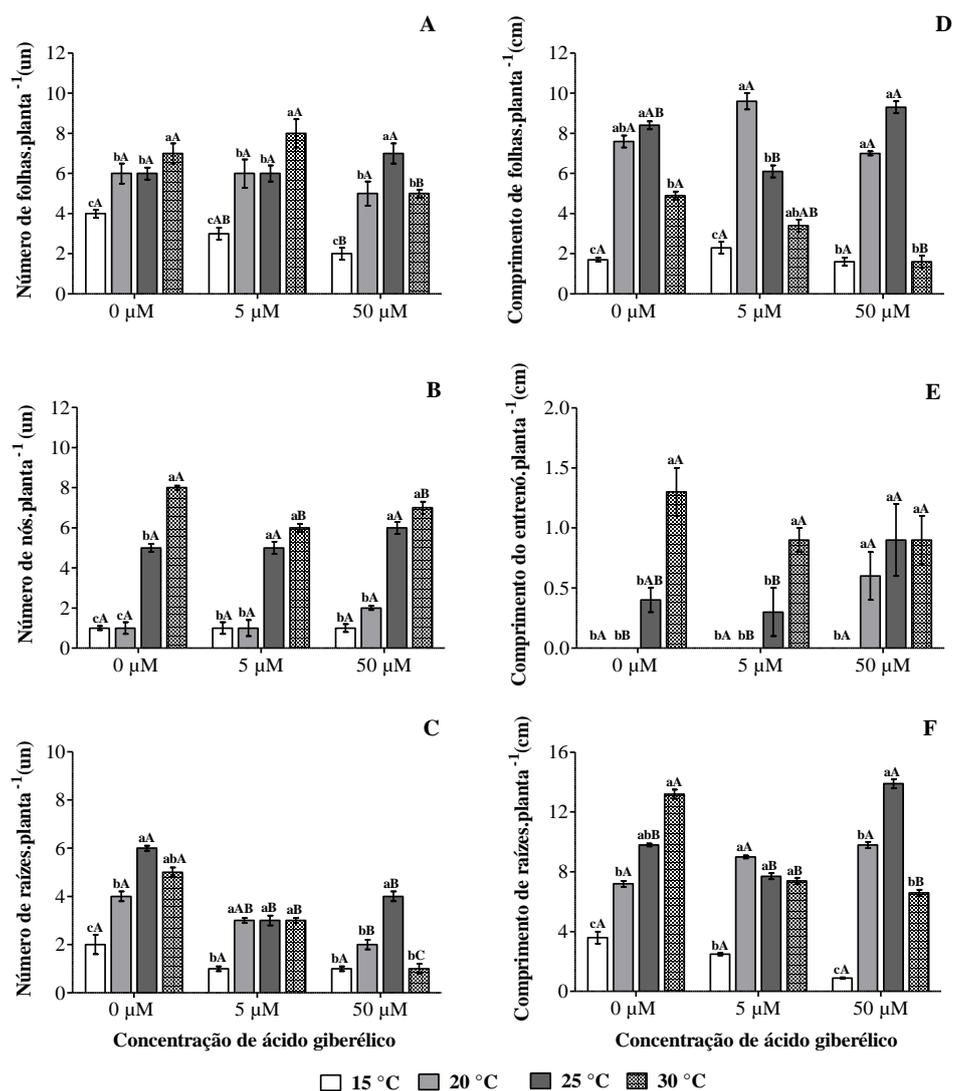


Figura 19 – Número de folhas (A), comprimento médio da maior folha (B), número de nós (C), comprimento do entrenó (D), número de raízes (E) e comprimento médio da maior raiz (F) de plantas de *A. strobilacea* provenientes do cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodais mantidos a 15, 20, 25, e 30 °C em meio nutritivo MS/5 adicionados ou não de 5 e 50 μM de ácido giberélico. Letras minúsculas na indicam diferenças entre as temperaturas, dentro de cada concentração de ácido giberélico e letras maiúsculas na indicam diferenças entre as

concentrações de ácido giberélico, segundo teste de Tukey com nível de significância a 5%. Os valores representam a média composta de plantas (n=25).

As giberelinas são hormônios vegetais conhecidos por regularem diversas fases do desenvolvimento de plantas. A giberelina bioativa presente em uma determinada espécie é acompanhada por uma dúzia ou mais de giberelinas que são, provavelmente, precursores inativos ou produtos desativados das formas ativas. Giberelina A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>), também conhecida por ácido giberélico, tem sido identificada em 45 plantas. O maior acúmulo de ácido giberélico é encontrado no fungo *Gibberella fujikuroi*, do qual é produzido comercialmente. O ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) é usado para promover germinação de sementes, alongamento caulinar, e crescimento de fruto em uma variedade de plantas de interesse agrônômico e comercial. Plantas cultivadas *in vitro* a partir de segmentos nodais depositados em meio nutritivo contendo 5 e 50 µM de ácido giberélico ultrafiltrado em membrana de 45 µm e mantidas por 3 meses nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C apresentaram 100 % de sobrevivência.

O alongamento caulinar observado em plantas cultivadas em temperatura de 25 e 30 °C é decorrente da ação da giberelina endógena, uma vez que a adição de paclobutrazol (PBZ) (inibidor da síntese de giberelina) no meio de cultura inibiu este alongamento nas plantas cultivadas em 25 °C. A figura 20 mostra o efeito do PBZ sobre as plantas cultivadas em 15°C, 20 °C e 25 °C. A presença do PBZ no meio nutritivo em 5 e 50 µM inibiu o desenvolvimento da gema lateral presente nos segmentos nodais em cerca de 60 % (figuras 20 A e E respectivamente) em todas as temperaturas de cultivo, e em 100 % naqueles mantidos em 30 °C, o que indica uma possível função da giberelina endógena na atividade do meristema lateral na formação de uma nova planta. As plantas geradas apresentaram redução no crescimento e intensas brotações curtas com caules não alongados, em todas as temperaturas de cultivo testadas (Figura 20). A figura 20 mostra o efeito de 5 µM (Figura 20B) e 50 µM (Figura 20C) de PBZ sobre as plantas cultivadas em 25 °C.

A identificação da participação de certas giberelinas no alongamento caulinar pode ser feita utilizando-se o paclobutrazol, o qual bloqueia a biossíntese de GA no estágio de conversão de *ent*-caureno a ácido *ent*-caurenoico (Rademacher 2000), como relatado para *Arabidopsis thaliana* (Stavang 2009).



Figura 20 – *A. strobilacea* cultivada *in vitro* a partir de segmentos nodais em meio nutritivo contendo 5  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol e mantidos em 15  $^{\circ}\text{C}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$  e 25  $^{\circ}\text{C}$  (B, C e D respectivamente) e 50  $\mu\text{M}$  de paclobutrazol e mantidos em 15  $^{\circ}\text{C}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$  e 25  $^{\circ}\text{C}$  (E, F, G e H respectivamente). Segmentos nodais cultivados em 5  $\mu\text{M}$  (A) e 50  $\mu\text{M}$  (E) que não apresentaram regeneração em nenhuma condição de cultivo testado. Barra = 1 cm.

A figura 21 mostra o aspecto morfológico de plantas de *A. strobilacea* cultivada *in vitro* em meio nutritivo contendo 5 e 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  e mantidas por 3 meses em câmara de germinação ajustadas em 15  $^{\circ}\text{C}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$ , 25  $^{\circ}\text{C}$  e 30  $^{\circ}\text{C}$ .

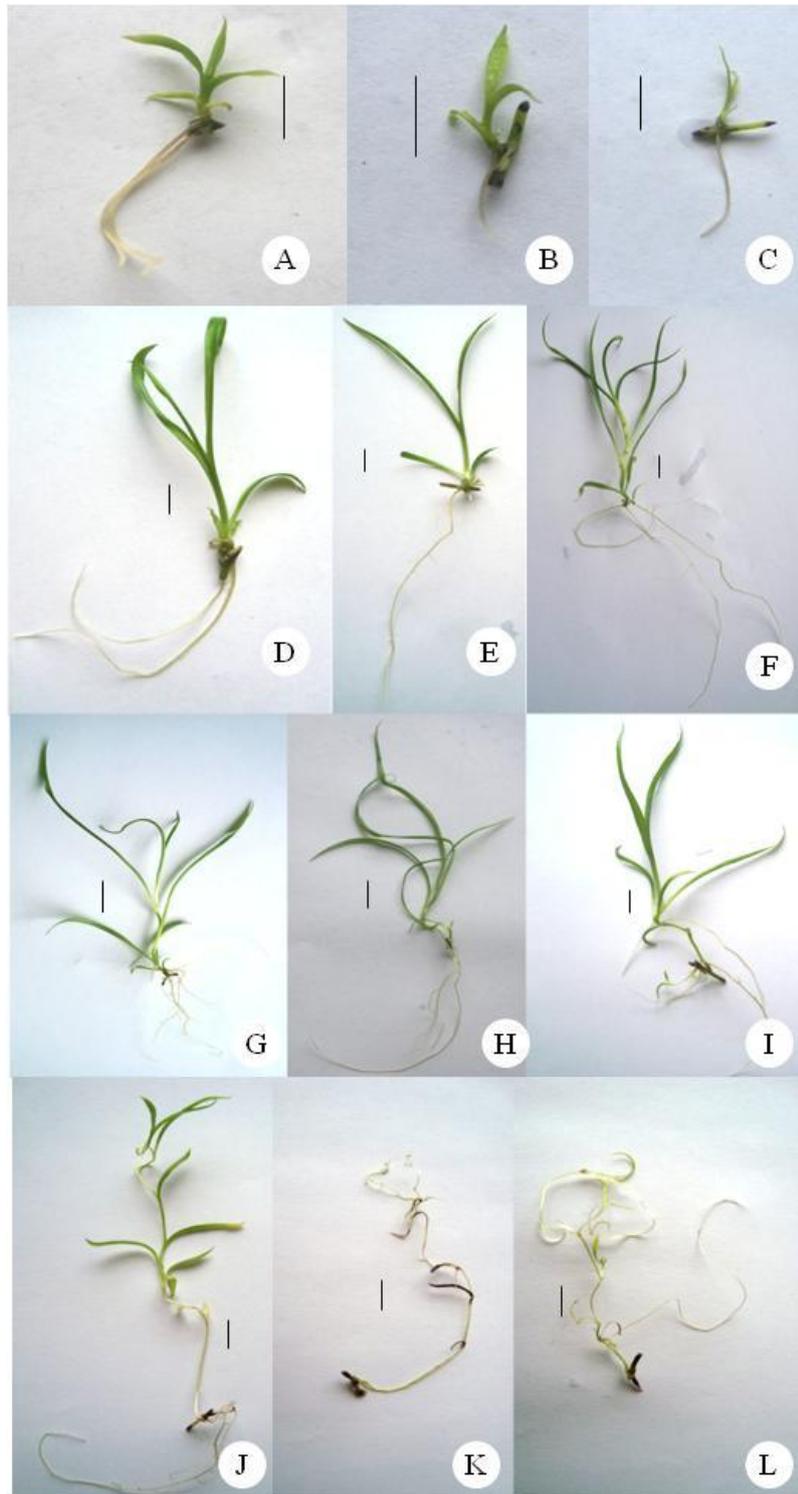


Figura 21 - *A. strobilacea* cultivada *in vitro* a partir de segmentos nodais sob 15 °C (A-C) em meio nutritivo sem fitorregulador (A), com 5  $\mu$ M (B) e 50  $\mu$ M (C) de ácido giberélico; sob 20 °C (D-F) sem fitorregulador (D), com 5  $\mu$ M (E) e 50  $\mu$ M (F) de ácido giberélico; sob 25 °C (G-I) sem fitorregulador (G), com 5  $\mu$ M (H) e 50  $\mu$ M (I) de ácido giberélico e 30 °C (J-L) sem fitorregulador (J), com com 5  $\mu$ M (K) e 50  $\mu$ M (L) Barra = 1 cm.

O ácido giberélico atua nos meristemas, regiões específicas de crescimento, quase todas as divisões nucleares (mitose) e as divisões celulares (citocinese) ocorrem nestas regiões meristemáticas. Nos nós, as gemas axilares contêm meristemas apicais para os ramos laterais (Taiz & Zeiger 2013). A presença de GA<sub>3</sub> no meio de cultura basal resultou no alongamento uniforme de brotos *Vriesea reitzii* cultivadas *in vitro*, sendo o maior alongamento observado em 10 µM (Rech Filho *et al.* 2005), contudo a temperatura de cultivo foi de 25 °C. Não existem trabalhos que relatam o efeito do ácido giberélico no alongamento caulinar de bromélias cultivadas em temperatura sub-ótima de cultivo.

O ácido giberélico promove o alongamento caulinar nas plantas de 20 °C, contudo é dose e temperatura dependente, 50 µM de ácido giberélico e somente nas plantas de 20 °C.

#### *4.3 Avaliação da influência do cálcio no crescimento de plantas de A. strobilacea mantidas in vitro em diferentes temperaturas*

Nos testes referentes ao cálcio, um dos principais resultados obtidos foi observado nas plantas cultivadas em 30 °C. Esse mineral parece ser essencial para o crescimento e desenvolvimento geral da planta, pois em meio nutritivo alterado com este íon, as plantas se apresentaram hiperídricas (figura 22) e, quando adicionado de ionomicina e EGTA, além de deformações, apresentaram necrose nas folhas (figura 28C). Outro resultado relacionado ao cálcio refere-se às plantas cultivadas em 20 °C. Elas apresentaram alongamento caulinar, aspecto morfológico observado apenas quando adicionado 50 µM de GA<sub>3</sub>, e, quando cultivadas em 6 e 9 mM de cálcio, um menor comprimento do entrenó. Quando foi adicionado EGTA no meio de cultura, também se observou o alongamento. Em relação às plantas mantidas em 15 e 25 °C, não foram observadas diferenças marcantes neste tratamento, sugerindo que a temperatura é fator determinante no seu crescimento.

##### *4.3.1 Meio nutritivo alterado em sua concentração de Cálcio*

O meio MS/ 5 foi alterado em sua composição de modo a atender as diferentes concentrações de cálcio sem alterar o balanço iônico da solução (ver tabela 1 item 5.5.1). Desse modo, este experimento mostra a influência do cálcio sobre o desenvolvimento dos

segmentos nodais. Plantas mantidas em 30 °C, em todas as concentrações de cálcio, apresentaram alteração na morfologia (Figura 22).



Figura 22- Aspecto da planta de *A. strobilacea* cultivada *in vitro*, sob temperatura de 30 °C, em meio nutritivo contendo diferentes concentrações de cálcio.

Quando cultivadas em 30 °C em meio MS alterado em sua composição iônica, as plantas apresentaram desenvolvimento anormal, como observado na figura 22, impossibilitando a quantificação dos dados no mesmo formato para inclusão nos gráficos.

Plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio nutritivo com conteúdo de cálcio modificado apresentou redução do crescimento em 15 °C em todas as concentrações de cálcio presente no meio nutritivo, quando comparadas com as plantas das demais condições térmicas. Utilizou-se para esta afirmação a observação do número de folhas e raízes, além do comprimento de folha e raízes, e massas fresca e seca da parte aérea. Não foram observadas diferenças significativas entre as massas fresca e seca da raiz das plantas mantidas nas

diferentes condições térmicas cultivadas nos diferentes meios nutritivos. Quando mantidas em 25 °C 6,0 e 9,0 mM de cálcio, as plantas apresentaram número de folhas significativamente maiores quando comparadas com as plantas cultivadas na mesma condição térmica com diferentes concentrações do íon. O mesmo não foi observado para 15 e 25 °C (Figura 23 A).

Efeito pronunciado do cálcio no meio de cultura foi observado no alongamento do eixo caulinar das plantas (Figura 23 E). O efeito inibitório de alongamento caulinar observado nas plantas, quando cultivadas em 20 °C, foi superado pela alteração da concentração iônica no meio. Não foram observadas, porém, diferenças no número de nós entre as concentrações de cálcio. Contudo, com a presença de 3,0; 6,0 e 9,0 mM de cálcio no meio, o comprimento do entrenó foi significativamente menor, em comparação com o meio sem cálcio e com 0,6 mM, indicando que a maior concentração de cálcio pode ter tornado a parede mais rígida, impondo resistência para o alongamento celular (Hepler 2005). Resposta semelhante foi observada em 25 °C, em que maiores concentrações de cálcio resultaram em menor comprimento do entrenó, quando comparado com os meios nutritivos sem o íon. Todavia essa resposta não foi observada nas plantas obtidas em 15 °C. Em relação ao sistema radicular, a presença do íon teve um efeito inibitório no número de raízes produzidas nas plantas mantidas em 25 °C, pois os valores foram significativamente menores, quando comparados às plantas mantidas no meio sem cálcio. Nos demais tratamentos térmicos, não foram observadas diferenças significativas nestes parâmetros entre as plantas mantidas nas diferentes concentrações de cálcio. A ainda nesta condição térmica, não foram observadas diferenças significativas neste parâmetro. Os dados sugerem ainda que 0,3 mM de cálcio no meio sob 15°C é uma concentração desfavorável para o cultivo *in vitro* de *A. strobilacea*, tendo em vista que as plantas apresentaram menor número de folhas e raízes.

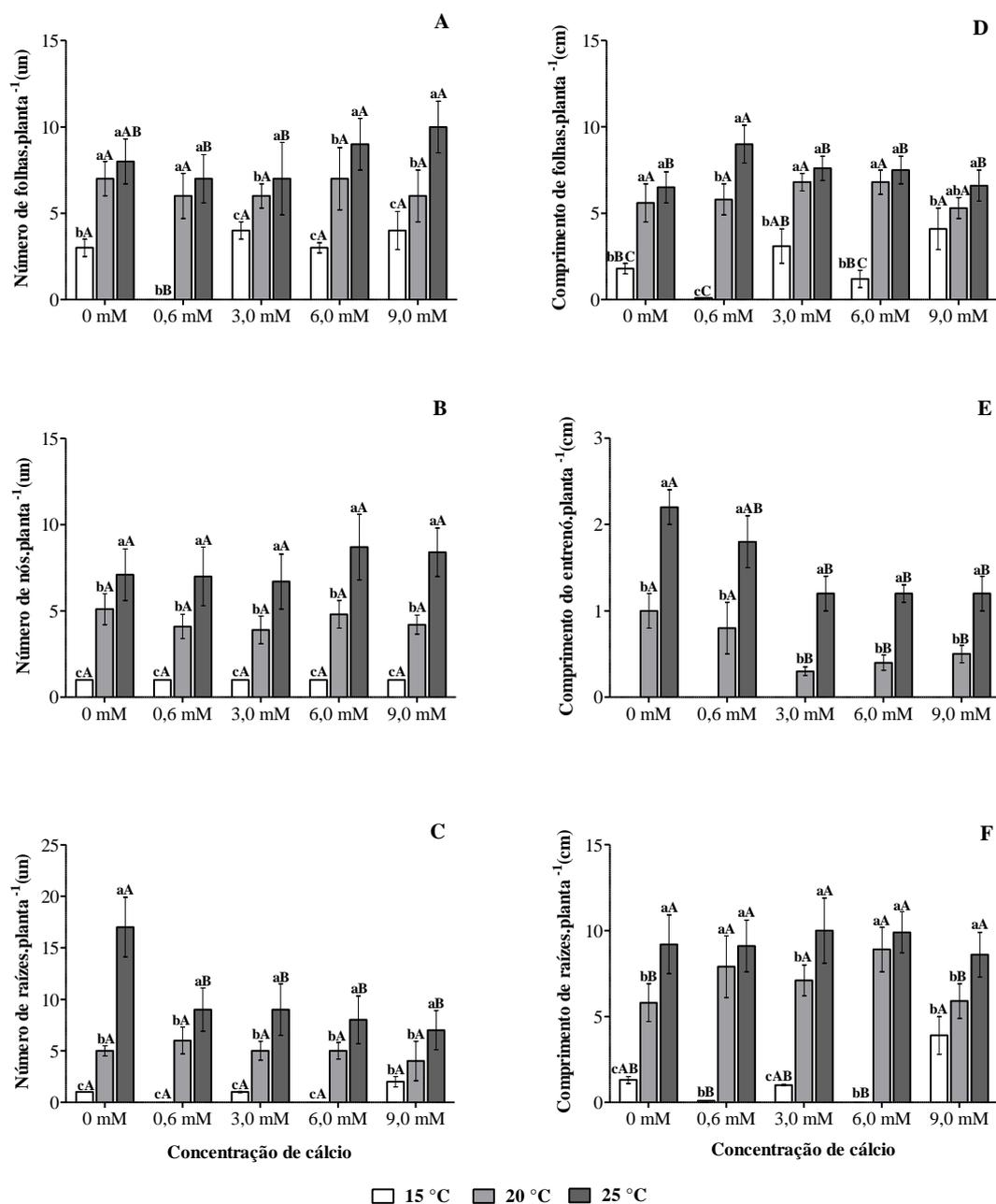


Figura 23– Número de folhas (A), comprimento médio da maior folha (B), número de nós (C), comprimento do entrenó (D), número de raízes (E) e comprimento médio da maior raiz (F). Médias acompanhadas por letras minúsculas comparam os valores entre as temperaturas dentro de uma mesma concentração de cálcio, e maiúsculas comparam as médias entre as diferentes concentrações dentro de uma mesma temperatura. Médias acompanhadas por letras distintas indicam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

A plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* sob temperatura de 20 °C apresentaram conteúdo de todos os pigmentos fotossintéticos significativamente maiores, quando

comparados com os demais tratamentos térmicos, em todas as concentrações de cálcio testadas, inclusive quando cultivadas em meio nutritivo sem o íon (figura 24), com exceção apenas para clorofila b e carotenóides em que foram significativamente iguais às plantas cultivadas em 25 °C em meio sem cálcio e com 3 mM do íon. E plantas cultivadas em 15 °C apresentaram conteúdo de pigmentos significativamente menor, quando comparados com as plantas mantidas em 20 °C. Quando cultivadas em 0,6 e 6,0 mM, o conteúdo de pigmentos foram estatisticamente igual entre as plantas mantidas em 25 e 15 °C. Entre a mesma temperatura em concentrações distintas de cálcio não foram observadas diferenças significativas nos diferentes tratamentos.

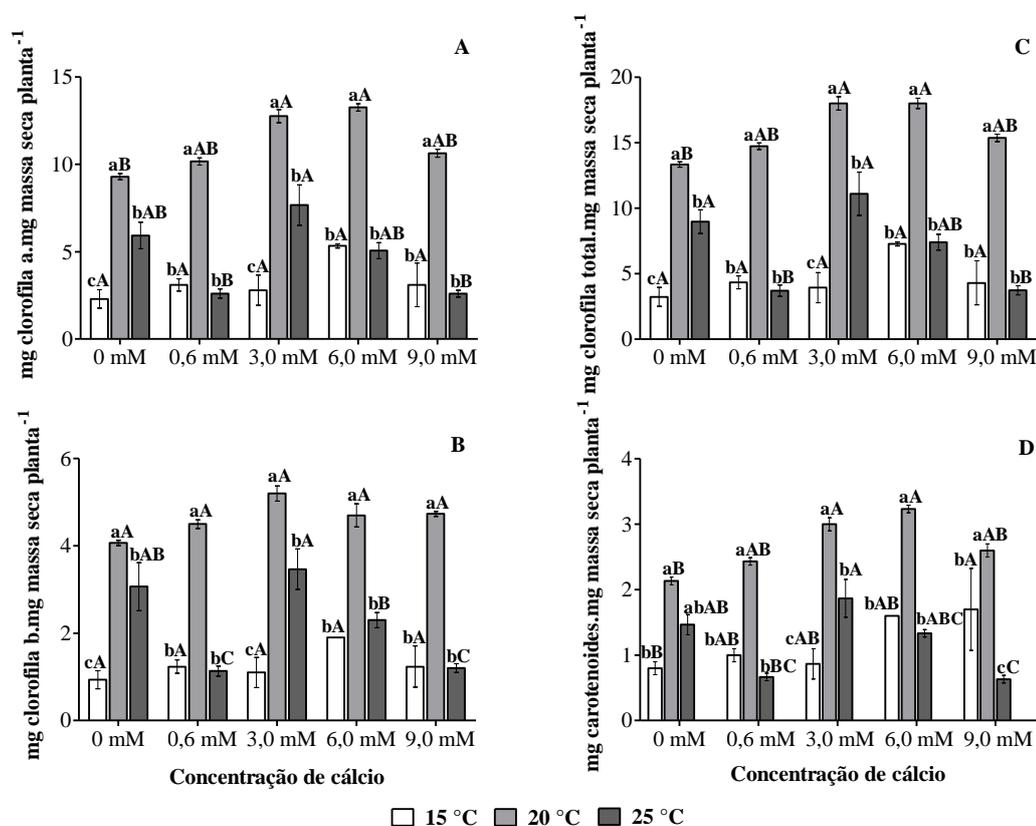


Figura 24 – Conteúdo de Clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenóides de plantas de *A. strobilacea* cultivadas em meio nutritivo com diferentes concentrações de cálcio (0,6; 3,0; 6,0 e 9,0 mM) em diferentes temperaturas (15 °C, 20 °C e 25 °C). Médias acompanhadas por letras minúsculas comparam os valores entre as temperaturas dentro de uma mesma concentração de cálcio, letras distintas indicam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

O cálcio intracelular está relacionado às respostas de adaptação da planta ao frio (Ruelland & Zachiwski 2010). Apesar disso, *A. strobilacea* se mostrou resistente à baixa

temperatura de cultivo, pois, em todos os testes, houve 100 % de sobrevivência, quando as plantas foram cultivadas em 15 °C constantes. O efeito do cálcio parece ser estrutural, o aumento do comprimento do entrenó observado nas plantas cultivadas em 20 °C indica menor resistência da parede no alongamento celular, visto que o alongamento do eixo caulinar de *A. strobilacea* está relacionado com o alongamento celular. Apesar da evidência do papel do influxo de cálcio como sinalizador da resposta de alongamento celular mediado pela giberelina, altas concentrações de cálcio no meio nutritivo na propagação de *Gypsophila paniculata* não proporcionam alongamento caulinar típico da espécie quando cultivada em meio nutritivo com menor concentração de cálcio (Takane *et al.* 1994).

#### 4.2 Adição de ionomicina e EGTA no meio nutritivo

Para investigar a ação isolada do cálcio no crescimento e desenvolvimento de plantas de *A. strobilacea*, foi utilizado um ionóforo de cálcio – a ionomicina, um antibiótico capaz de extrair íons a partir de uma fase aquosa para uma fase orgânica. Ele também atua como transportador de cátion através de uma barreira de solvente com grande afinidade pelo cálcio (Liu & Hermann 1978), que tem por finalidade estimular a liberação do cálcio presentes nas organelas celulares, aumentando os níveis deste íon no citosol. O cálcio atua como mensageiro em muitos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas e em resposta a diversos estresses bióticos e abióticos (Reddy 2001). Como controle negativo, foi utilizado o EGTA (ácido etilenoglicol- bis(-aminoetileter)- tetraacético), que atua como quelante do íon cálcio e, estando ligado ao íon, impede sua ação. Esse quelante pode remover o cálcio ligado à parede celular (Hepler & Wayne 1985), tornando-a mais plástica. Nesse experimento, somente o meio nutritivo adicionado de EGTA foi alterado, não sendo adicionado o cálcio, visando garantir que a ação do quelante ocorresse no cálcio endógeno e não no meio. O aumento na concentração de cálcio citosólico induzido pelo frio constitui o mecanismo de detecção primário para baixas temperaturas (Minorsky 1989). Este íon se liga aos fosfolípidos, estabilizando a bicamada lipídica e assim provém a integridade da membrana celular (Hepler 2010). As repostas relacionadas ao  $Ca^{2+}$  estão envolvidas em uma adaptação de longo prazo para o frio (D'Angeli *et al.* 2003). Entretanto a utilização de ionomicina e EGTA no meio de cultura não alterou a resistência da planta ao frio. Além disso, durante todo o trabalho, foi constatado que *A. strobilacea*, quando cultivada *in vitro* a partir de segmentos

nodais, é uma planta resistente e o maior papel observado para o cálcio está relacionado ao alongamento do eixo caulinar da planta.

A análise de componentes principais mostrou que as principais tendências de variação dos parâmetros biométricos avaliados das plantas nas diferentes temperaturas e concentração de ionomicina e EGTA podem ser visualizadas pela análise de componentes principais (PCA), que resumiu 83 % da variabilidade conjunta dos dados nos dois primeiros eixos (figura 25). O eixo 1 de ordenação (65 % de variabilidade) apresenta a separação das unidades amostrais nas temperaturas de 15° C e 30° C e as ordenou completamente. Do lado direito do eixo 1, foram ordenadas as observações do período de 15° C, independente da concentração de ionomicina e EGTA presente no meio de cultura, sendo que as plantas cultivadas nessa condição térmica estão intimamente relacionadas entre si. De forma inversa, no lado esquerdo do eixo, ordenam-se as plantas mantidas em 30 °C. As unidades amostrais das plantas mantidas nessa condição térmica estão mais relacionadas aos parâmetros avaliados, quando comparadas com as plantas mantidas em 15 °C. Plantas mantidas em 30 °C apresentam maior relação com os parâmetros de alongamento, número de nós (n.no) e comprimento do entrenó (c.ent.). O maior alongamento ocorre nas plantas mantidas em 30 °C. Contudo, conforme explicitado no gráfico a seguir, essa condição térmica não é favorável ao cultivo de *A. strobilacea*, por induzir alterações morfológicas que comprometem a sobrevivência da planta.

O eixo 2 (18% de variabilidade) separou as unidades amostrais das plantas mantidas em 25° C heterogeneamente, as plantas desse tratamento térmico, controle, sem a adição de ionomicina ou EGTA se concentram nos parâmetros relacionados ao número de folhas (n folha) e raízes (n raiz), bem como comprimento da folha (c folha) e raiz (c raiz). Em seu lado negativo, há uma concentração de dados próximos às plantas cultivadas em 20 °C, mostrando grandes semelhanças entre as plantas obtidas a partir do cultivo *in vitro* nas duas condições térmicas, porém a proximidade dos dados de 25 °C próximo aos vetores indicam que essa condição térmica é mais apropriada para o crescimento, resultado semelhante ao observado com os resultados de ácido giberélico desta condição térmica. Os dados referentes às plantas mantidas em 20 °C concentram-se no lado negativo do eixo 2, e estão relacionadas entre si, e com plantas mantidas em 15 °C, esse resultado sugere que o crescimento das plantas nessa condição térmica são bem similares, com a diferença de que as plantas tratadas com EGTA estão mais próximas dos vetores, indicando ser esse tratamento adequado ao crescimento das

plantas e também apontam para a possibilidade de indução do alongamento caulinas das plantas cultivadas em meio nutritivo na presença desta substância.

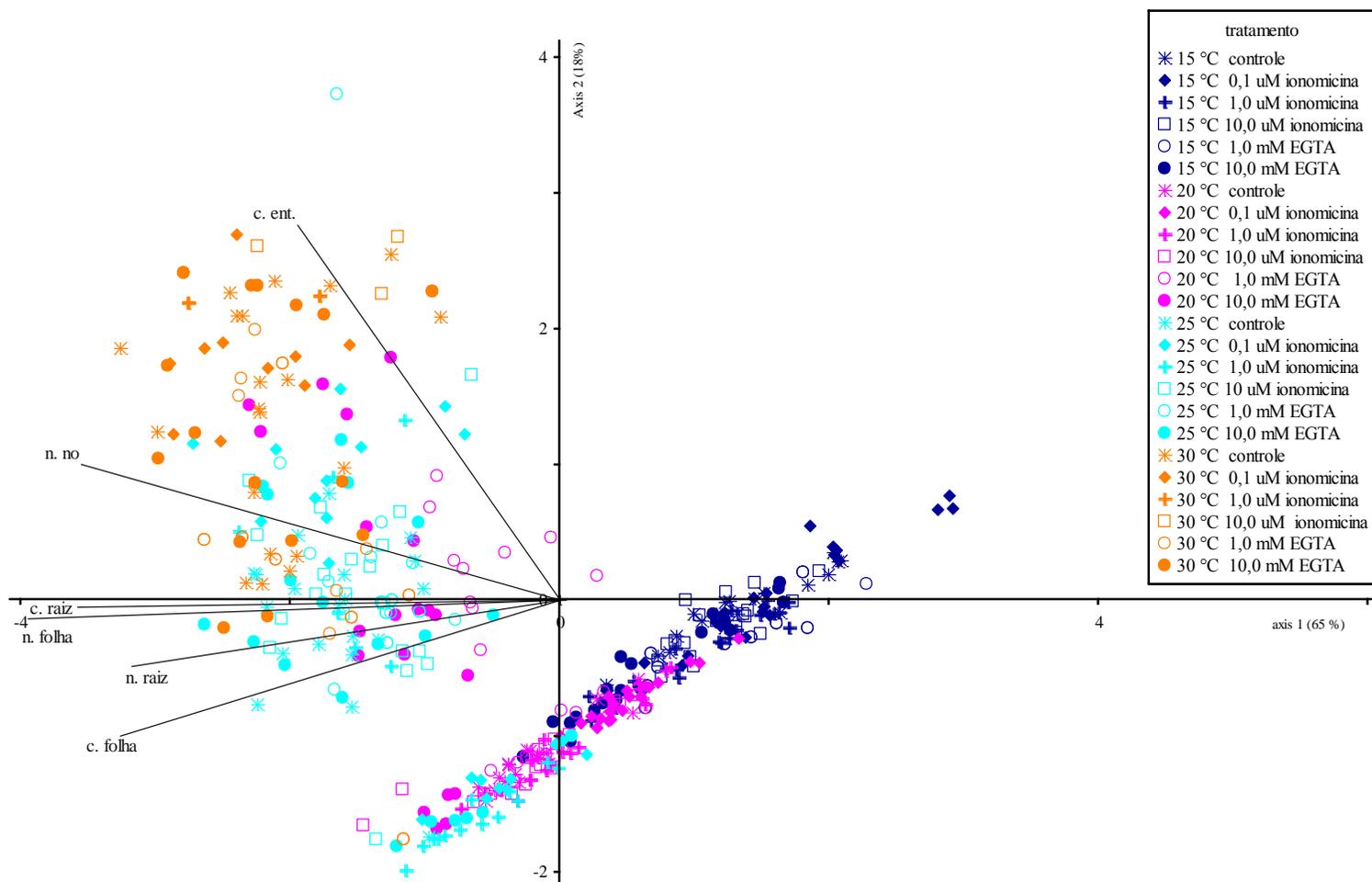


Figura 25– Ordenação (PCA) dos parâmetros avaliados das plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* em 15, 20, 25 e 30 °C, em meio nutritivo contendo 0,1; 1,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  ionomicina e 1,0 e 10,0 mM EGTA por 3 meses.

A presença de ionomicina e EGTA no meio de cultura nas concentrações testadas neste estudo não alteraram significativamente o número e o comprimento das folhas, assim como das raízes entre as plantas mantidas em 15 °C, durante os três meses de cultivo (figura 26). Isso sugere que, nessa condição térmica, a presença ou não do cálcio no ambiente intracelular não influencia no aumento nos valores destes parâmetros. Dentre as plantas cultivadas em 20 °C, aumento no número de folhas foi observado nas plantas cultivadas em meio nutritivo acrescido de 10 nM de EGTA. Nesse meio de cultura, as plantas mantidas em 20 °C apresentaram um número significativamente maior de folhas, inclusive quando comparados com os demais tratamentos térmicos, lembrando que, na presença do quelante de cálcio, o meio de cultura estava desprovido de fontes de cálcio, garantindo que o efeito da substância ocorresse no cálcio presente no hialoplasma da célula vegetal. Entre as plantas mantidas em 25 °C, o aumento significativo do número de folhas ocorreu apenas nas plantas cultivadas em meio acrescido de 1 µM ionomicina. A presença de 1 µM ionomicina no meio de cultura ainda reduziu significativamente o comprimento das folhas das plantas mantidas em 20 e 25 °C, comparadas com as plantas cultivadas em meio nutritivo sem adição da substância. O número de segmentos nodais e o comprimento do entrenó foram os parâmetros escolhidos para identificar o alongamento do eixo caulinar das plantas micropropagadas de *A. strobilacea*. A figura 26 mostra que quando *A. strobilacea* é cultivada *in vitro* em 15 °C, o alongamento é completamente inibido, independente da presença da ionomicina ou EGTA, à semelhança do que foi visto até agora. Quando mantidas em 20 °C, em meio nutritivo básico, desprovido de ionomicina e EGTA, não apresentaram alongamento do eixo caulinar das plantas. Essa característica não foi alterada com adição de ionomicina no meio, temperatura baixa foi preponderante na manutenção da planta não alongada, entretanto a presença do quelante no meio induziu o fenótipo alongado, cujos valores alcançaram níveis significativamente iguais às plantas mantidas sob 25 °C (temperatura controle). Esses resultados mostram que a retirada do cálcio do meio intracelular favoreceu o aumento do eixo caulinar por meio do aumento no número de nós e na distância do interno, e esse aumento foi maior na maior concentração de EGTA utilizada. Moll & Jones (1981) observaram que a adição de EGTA pode causar um aumento na taxa de crescimento de segmentos de hipocótilos isolados na ausência de ácido giberélico no mesmo nível de crescimento induzido pelo fitorregulador. Os referidos autores afirmam que a diminuição deste cátion divalente em níveis menores que o normal para a célula promove, rapidamente, o crescimento de hipocótilo

de *Lactuca sativa* L.. A rápida resposta de crescimento na presença deste quelante indica a capacidade da substância de remover o cálcio da parede celular.

Quando cultivadas em 25 °C, o alongamento do caule foi observado em todas as plantas, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos testados. Isso mostra que a inibição do alongamento do eixo caulinar das plantas micropropagadas de *A. strobilacea* ocorre apenas em baixas temperaturas, e sugere que, devido ao fato da característica alongada surgir em plantas cultivadas em meio sem fonte externa de cálcio e ainda na presença de um quelante do íon, o cálcio, mediado por baixas temperaturas, pode ser necessário na manutenção da planta não alongada. Em 25 °C, foram observadas maior número de nós nas plantas cultivadas em diferentes concentrações de ionomicina, fator que pode estar relacionado ao fato de que tanto a mitose quanto a citosinese são eventos regulados pelo cálcio (Hepler & Wayne 1985).

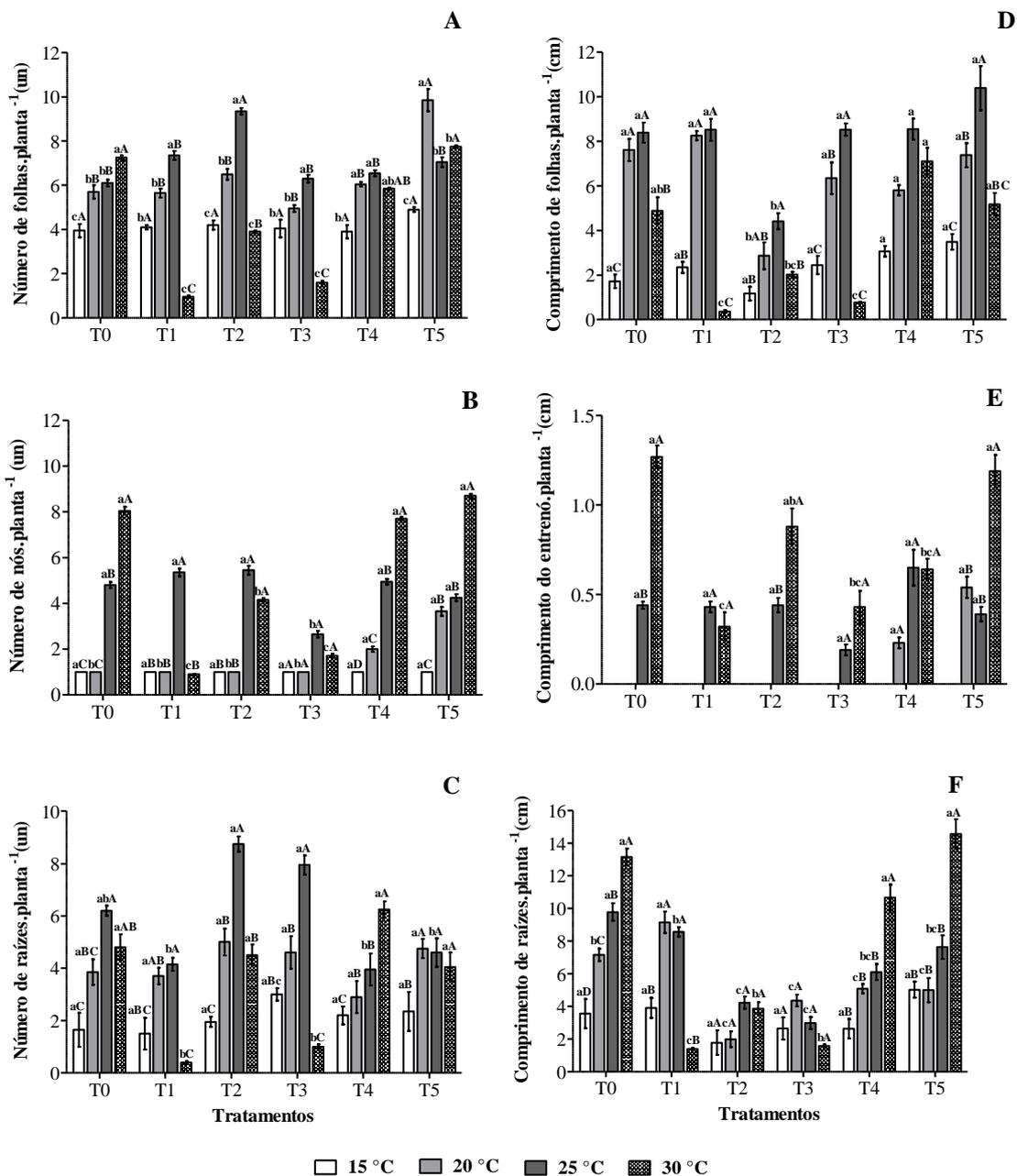


Figura 26 - Número de folhas (A), comprimento médio da maior folha (B), número de nós (C), comprimento do entrenó (D), número de raízes (E) e comprimento médio da maior raiz (F). T0 – MS/5, T1 - 0,1  $\mu$ M de ionomicina, T2 – 1,0  $\mu$ M de ionomicina, T3 - 10  $\mu$ M de ionomicina, T4 - 1,0 mM de EGTA e T5 - 10,0 mM de EGTA. Médias acompanhadas por letras minúsculas comparam os valores entre as temperaturas dentro de uma mesma concentração de cálcio, e maiúsculas comparam as médias entre as diferentes concentrações dentro de uma mesma temperatura. Médias acompanhadas por letras distintas indicam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

As análises de conteúdo de massa seca e fresca das partes aéreas e radiculares mostram que, quando a planta é cultivada em 30 °C, apresentam maior conteúdo de massa seca, tanto da parte aérea quanto da raiz, se cultivadas em meio contendo 10 mM de EGTA (Figura 27). Esta substância pode ter atuado de modo a facilitar a absorção e acúmulo de outros minerais, por alterar a rigidez da membrana (Hepler & Wayne 1985), sendo que a alta temperatura, normalmente, reduz o acúmulo de matéria seca na planta, comprometendo, inclusive, produtividade de muitas espécies cultiváveis (Wahid *et al.* 2007). Em relação aos demais tratamentos, não foram observadas diferenças significativas entre as demais condições térmicas testadas.

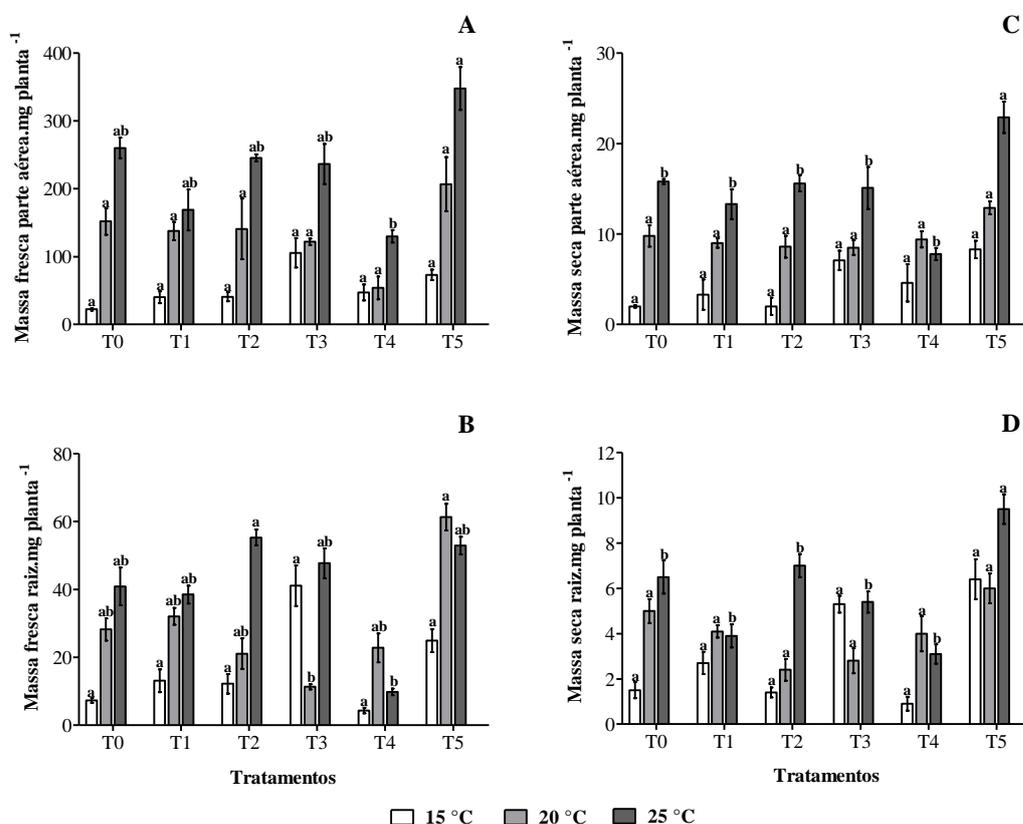


Figura 27 - Massa fresca da parte aérea (A) e radicular (B), massa seca da parte aérea (C) e radicular (D). T0 – MS/5, T1 - 0,1 μM de ionomicina, T2 – 1,0 μM de ionomicina, T3 - 10 μM de ionomicina, T4 - 1,0 mM de EGTA e T5 - 10,0 mM de EGTA. Médias acompanhadas por letras distintas indicam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

O teor de pigmentos fotossintéticos foi quantificado apenas nas plantas dos tratamentos térmicos de 15 °C, 20 °C e 25 °C. Constatou-se que cerca de 70 % das plantas

mantidas em 30 °C apresentaram alterações morfológicas (figura 28) e foi possível apenas realizar coletas de dados biométricos.



Figura 28 – Plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* a partir de segmentos nodais em meio MS/5 adicionado de 1nM de ionomicina (A), 1 nM de EGTA (B) e 10 nM de EGTA. Barra = 1 cm.

As plantas cultivadas em 15 °C na presença de 1  $\mu$ M apresentaram conteúdo de clorofila a, b, total e carotenoides significativamente maiores, quando comparadas com as plantas da mesma condição térmica dos demais tratamentos. Esse resultado sugere um possível efeito protetor do cálcio no tratamento das plantas ao frio e, quando comparado com as plantas mantidas em 20 e 25 °C, não apresenta diferenças significativas (Figura 29).

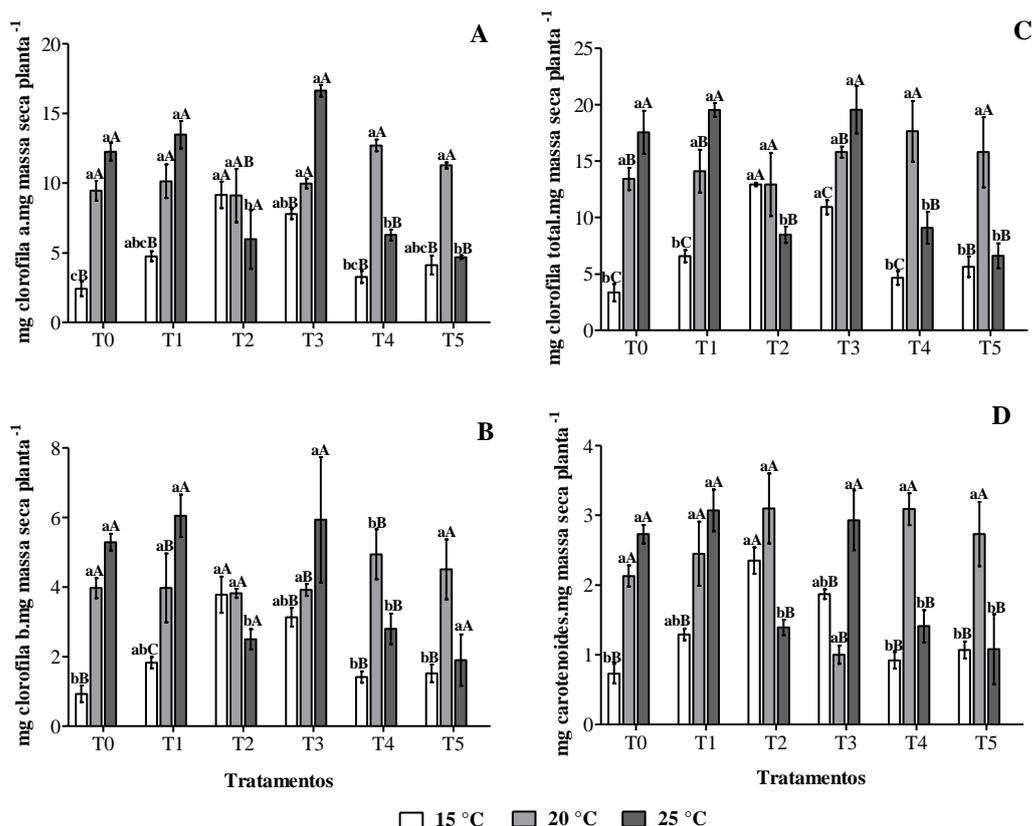


Figura 29 – Conteúdo de pigmentos fotossintéticos, (A) clorofila a, (B) clorofila b, (C) clorofila total e (D) carotenoides. Médias acompanhadas por letras maiúsculas comparam os valores entre as temperaturas dentro de uma mesma concentração de cálcio, e minúsculas comparam as médias entre as diferentes concentrações dentro de uma mesma temperatura.

Estudos realizados com a bromélia *Aechmea nudicaulis* revela a importância do cálcio no crescimento da planta. A análise mineral desta espécie, cultivadas em meio de Murashigue & Skoog (1962) com metade dos macronutrientes (MS/2), sugeriu a necessidade de um ajuste mais fino de alguns dos minerais no meio de cultura, especialmente Ca. Outras bromélias, como *Vriesea friburguensis*, *Vriesea hieroglyphica* e *Vriesea unilateralis*, apresentaram massa fresca e seca significativamente superiores, quando cultivadas em meio com maiores conteúdos de Ca e Cl (Aranda-Peres *et al.* 2009).

## 5. Considerações finais e perspectivas

O presente estudo mostrou que plantas de *A. strobilacea* sobrevivem a temperaturas baixas, apresentando redução do crescimento em até 5 vezes quando mantidas a 15 ° C, em relação a outras cultivadas em 25° C. Esse resultado concorda com a hipótese formulada neste trabalho sobre a possibilidade de utilizar temperaturas baixas para a formação de uma coleção sob crescimento lento dessa espécie tropical. A capacidade que bromélias possuem de tolerar temperaturas baixas pode estar associada à adaptação que muitas espécies apresentam para sobreviver às variações térmicas encontradas no habitat, como o Cerrado e Mata Atlântica, onde *A. strobilacea* pode ser encontrada. Os resultados mostrados acerca do crescimento dessa espécie sob temperaturas baixas contemplam objetivos do projeto “Estudos integrados visando ao conhecimento interdisciplinar nas famílias Bromeliaceae e Xyridaceae”, financiado pelo Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB-CAPES) cuja proposta inclui a ampliação das coleções vivas dos grupos de estudo.

Adicionalmente, foi verificada também a possibilidade de manutenção *in vitro* segmentos nodais sob 10 °C, por até 3 meses, estabelecido um limite térmico para o desenvolvimento da gema lateral nesse tipo de micropropagação. Além disso, os resultados do cultivo a 30 °C permitiram mostrar que essa temperatura pode ser o limite térmico superior para manutenção *in vitro* das plantas de *A. strobilacea* que apresentaram desordens morfológicas que comprometeram sua sobrevivência.

Foi possível observar a influência da temperatura sobre o alongamento caulinar em plantas. Quando mantidas em 15 °C e 20 °C, as plantas permaneceram em roseta, enquanto que o aumento da temperatura para 25 °C e 30 °C induziu o aumento do comprimento do entrenó.

Este trabalho mostrou que, quando ocorre o alongamento caulinar em plantas de *A. strobilacea*, este é promovido por giberelina. Esta hipótese foi confirmada pela presença de paclobutrazol, o inibidor da síntese de giberelina, no meio de cultura. A presença desta substância no meio reestabeleceu o crescimento em roseta das plantas mantidas em 25 °C. O GA<sub>3</sub> induziu o alongamento nas plantas em roseta cultivadas em 20 °C, mas não naquelas mantidas em 15 °C, mostrando que sua ação pode depender da faixa térmica na qual as

plantas são mantidas. Esse resultado mostra que o restabelecimento do alongamento caulinar pelo GA<sub>3</sub> não ocorre em todas as temperaturas testadas e que sua ação também está associada à concentração utilizada. Esta alteração do padrão de crescimento em roseta para caulescente observada nas plantas a 20 °C foi promovida pela aplicação do GA<sub>3</sub> exógeno, porém somente quando este foi ultrafiltrado no meio. Portanto, este estudo mostra que a giberelina está envolvida no processo de sinalização do alongamento caulinar dessa espécie e que esta resposta foi dependente da temperatura de cultivo. Todavia, estudos que avaliem os efeitos de hormônios como auxina devem ser realizados.

Com referência ao objetivo de avaliar a influência do cálcio na tolerância dessa planta ao resfriamento, este estudo mostrou que plantas de *A. strobilacea* são resistentes a temperatura baixa, não sendo possível verificar os eventos de sinalização mediados pelo cálcio na adaptação da planta ao frio, como tem sido relatado na literatura para espécies nativas de clima temperado. É possível supor que essa resistência seja devida a fatores como adaptação ao seu ambiente natural. Estudos sobre esses fatores contribuirão para ampliar nosso conhecimento sobre esse processo.

Os efeitos observados por meio dos testes de cálcio mostraram a forte influência deste mineral no padrão de alongamento das plantas, evidenciando o papel do cálcio na estrutura celular desta bromélia, principalmente nas plantas mantidas em 20 °C, haja vista que o meio de cultura com maiores concentrações de cálcio reduziu o comprimento do entrenó. Além disso, a presença do EGTA, quelante de cálcio, induziu maior comprimento do entrenó, sugerindo que a associação do cálcio com as pectinas da parede ofereceram resistência ao alongamento caulinar de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*. De modo interessante, esse padrão não foi constatado quando as plantas foram mantidas a 15° C.

Os resultados deste trabalho mostraram ainda uma possível interação entre o ácido giberélico, o cálcio e a temperatura no alongamento caulinar de *A. strobilacea*. Foi constatado que o ácido giberélico, juntamente com o cálcio, promoveu a alteração do crescimento em roseta para caulescente nas plantas de *A. strobilacea*, porém somente quando estas foram mantidas em 20 °C. O fato de as plantas mantidas a 15° C não apresentarem o alongamento com a presença de GA<sub>3</sub>, ou variando-se as concentrações de cálcio, ou ainda, utilizando os

quelante EGTA, que torna o cálcio indisponível para eventos de sinalização, apontam que nessa condição térmica, o crescimento em roseta é fortemente mantido pela temperatura baixa. De modo importante, esse resultado corrobora a seleção dessa temperatura para o cultivo *in vitro* dessa espécie sob crescimento lento, pois, sob essa condição térmica, alterações morfológicas *in vitro* não são induzidas, viabilizando a manutenção das culturas.

Assim, foi confirmada a hipótese de que a temperatura pode modular o crescimento e o padrão de alongamento de plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*. Refutada as hipóteses de que o ácido giberélico poderia potencializar o alongamento do eixo caulinar nas plantas mantidas em todas as temperaturas de cultivo *in vitro*, sendo que isso ocorreu apenas a 20 °C. O papel do cálcio sobre a resistência ao frio não foi mostrado, contudo revelou-se sua influência sobre o alongamento caulinar de *A. strobilacea*.

Como perspectivas futuras, propõe-se cultivar diferentes espécies nativas de clima tropical *in vitro* em baixas temperaturas, de modo a aumentar a quantidade de espécies disponíveis para programas de conservação, e ainda aumentar o conhecimento sobre a fisiologia básica destas espécies, de modo a confirmar a interação entre a regulação hormonal e ambiental no padrão de crescimento do maior número de espécies possível.

## 6. Referências Bibliográficas

- Abbasi, F., Onodera, H., Toki, S., Tanaka, H., Komatsu, S.** 2004. OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant molecular biology*, 55(4), 541-552.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., Genschik, P.** 2008. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *The Plant Cell Online*, 20(8), 2117-2129.
- Adams, S.R., Cockshull, K.E., Cave, C.R.J.** 2001. Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Ann. Bot.* 88: 869–877.
- Aghaee, A., Moradi, F., Zare-Maivan, H., Zarinkamar, F., Irandoost, H.P., Sharifi, P.** 2013. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. *African Journal of Biotechnology*, 10(39), 7617-7621.
- Albim, E.D.M.** 2005. Assepsis and *in vitro* curaua axillary buds establishment (Ananas erectifolius LB Smith)-Bromeliaceae. *Revista de Ciências Agrárias*. 43: 17-28.
- Amoo, S.O., Finnie, J.F., Van Staden, J.** 2009. Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of *in vitro* propagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 99(2): 233-238.
- Anacleto, A., Negrelle, R.R.B., Koehler, H.S.** 2008. Germinação de *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb.(Bromeliaceae) em diferentes substratos alternativos ao pó de xaxim. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 30(1): 73-79.
- Appezato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M.** 2006. Anatomia Vegetal, edição revista e atualizada. 2ª ed., Editora UFV, Viçosa.
- Aranda-Peres, A.N., Peres, L.E.P., Higashi, E.N., Martinelli, A.P.** 2009. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. *HortScience*, 44(1), 106-112.
- Arrabal, R., Amancio, F., Carneiro, L.A., Neves, L.J., Mansur, E.** 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation* 11: 1081-1089.
- Banerjee, N., Langhe, E.** 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (Banana and plantain). *Plant Cell Reports*. 4: 351-354.
- Benincasa, M.M.P.** 2003. Análise de Crescimento de Plantas. Funep, Jaboticabal.
- Benson, E.E.** 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27: 141-219.

- Bencke, M., Droste, A.** 2008. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich. (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas, Botânica*. 59: 299-306.
- Benzing, D.H.** 1980. *The biology of the bromeliads*. California: Mad Revier Press. 305p.
- Benzing, D.H.** 2000. *Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K.
- Berghage, R. D., Heins, R. D.** 1991. Quantification of temperature effects on stem elongation in poinsettia. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(1), 14-18.
- Bonato, R.R., Muraro, D.** 2006. Aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich (Bromeliaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 28(2): 95-102.
- Browse, J., Xin, Z.** 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 241-246.
- Burr, K.E. Tinus, R.W.** 1996. Use of clones increases the power of physiological experiments on coastal Douglas-fir. *Physiologia Plantarum*. 96: 458-466.
- Burstrom, H.G.** 1968. Calcium and plant growth. *Biol. Rev. (Camb.)* 43: 287–316.
- Carvalho, S.M.P., Heuvelink, E., Cascais, R., Van Kooten, O.** 2002. Effect of day and night temperature on internode and stem length in chrysanthemum: is everything explained by DIF?. *Annals of Botany*, 90(1), 111-118.
- Carvalho, V. Santos, D.S.; Nievola, C.C.** 2014. *In vitro* storage under slow growth and *ex vitro* acclimatization of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea*. *South African Journal of Botany*, 92: 39-43.
- Carvalho, C.P., Hayashi, A.H., Braga, M.R., Nievola, C.C.** 2013. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry*. 71: 144-154.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J.K.** 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 55: 225–236.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K.** 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12(10), 444-451.
- Cui, L., Li, J., Fan, Y., Xu, S., & Zhang, Z.** 2006. High temperature effects on photosynthesis, PSII functionality and antioxidant activity of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Stud*, 47, 61-69.

- D'Angeli, S., Malhó, R., Altamura, M.M.** 2003. Low-temperature sensing in olive tree: calcium signalling and cold acclimation. *Plant science*, 165(6), 1303-1313.
- Davies, P.J.** 1995. *Plant Hormones—Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- De Siqueira, D.L., Salomão, L.C.C.** 2002. Efeitos do paclobutrazol no crescimento e florescimento dos citros. *Laranja, Cordeirópolis*. 23 (2): 355-369.
- Dewitte, W., Murray, J. A.** 2003. The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology*. 54 (1): 235-264.
- Emery, R.J.N., Pearce, D.W., Pharis, R.P., Reid, D.M., Chinnappa, C.C.** 2001. Stem elongation and gibberellins in alpine and prairie ecotypes of *Stellaria longipes*. *Plant growth regulation*. 35(1): 17-29.
- Engelmann, F.** 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1): 5-16.
- Evert, R.F.** 2006. *Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. Wiley. com.
- Farrell, A.D., Ougham, H.J., Tomos, A.D.** 2006. The effect of gibberellic acid on the response of leaf extension to low temperature. *Plant, cell & environment*. 29(7): 1329-1337.
- Figueiredo, M.L.** 2003. Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de Bromeliaceae nativas do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Fleet, C.M., Sun, T.P.** 2005. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current opinion in plant biology*. 8 (1): 77-85.
- Fráguas, C.B., Villa, F., Souza, A.V., Pasqual, M., Dutra, L.F.** 2003. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. *Revista Ceres*. 50: (292): 719-726.
- Freschi, L., Rodrigues, M.A., Tiné, M.A.S., Mercier, H.** 2010. Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *Journal of plant physiology*. 167 (18): 1577-1583.
- Fukuda, M., Matsuo, S., Kikuchi, K., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., Honda, I.** 2009. The endogenous level of GA<sub>1</sub> is upregulated by high temperature during stem elongation in lettuce through LsGA3ox1 expression. *Journal of plant physiology*, 166(18): 2077-2084.
- Gao, Y., Li, T., Zhao, Y., Liu, W., Wang, M.** 2010. Characterization of the gibberellic acid response of the *Brassica napus* L. em. Metzg. dwarf mutant NDF-1. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 57(4): 481-485.

- Gao, X.H., Xiao, S.L., Yao, Q.F., Wang, Y.J., Fu, X.D.** 2011. An updated GA signaling 'relief of repression' regulatory model. *Molecular plant*, 4(4), 601-606.
- García-Martínez, J.L., Gil, J.** 2001. Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *Journal of plant growth regulation*, 20(4): 354-368.
- Georgieva, K., Lichtenthaler, H.K.** 2006. Photosynthetic response of different pea cultivars to low and high temperature treatments. *Photosynthetica*. 44:569-578.
- Gilroy, S., Jones, R. L.** 1992. Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Plant Biology* 89: 3591-3595.
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Evans T. M., Hall, J.C., Pires, J.C., Berry, P.E., Sytsma K.J.** 2004. Ancient vicariance or recent long- distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American – African disjunction in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *International Journal of Plant Sciences* 165: S35 – S54.
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Berry, P.E., Sytsma, K.J.** 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23, 3–26.
- González, A.L., Fariña, J.M., Pinto, R., Pérez, C., Weathers, K.C., Armesto, J.J., Marquet, P.A.** 2011. Bromeliad growth and stoichiometry: responses to atmospheric nutrient supply in fog-dependent ecosystems of the hyper-arid Atacama Desert, Chile. *Oecologia*, 167 (3): 835-845.
- González-Benito, M. E., Martín, C.** 2011. *In vitro* preservation of Spanish biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 47(1): 46-54.
- Gray, W.M., Östin, A., Sandberg, G., Romano, C.P., Estelle, M.** 1998. High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 7197-7202.
- Hahn M., Walbot, V.** 1989. Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. *Plant Physiol.* 91: 930–938.
- Harrison, J., Nicot, C., Ougham, H.** 1998. The effect of low temperature on patterns of cell division in developing second leaves of wild-type and slender mutant barley (*Hordeum vulgare L.*). *Plant, Cell & Environment*. 21(1): 79-86.
- Hazebroek, J. P., Metzger, J. D., & Mansager, E. R.** 1993. Thermoinductive regulation of gibberellin metabolism in *Thlaspi arvense L.*(II. Cold induction of enzymes in gibberellin biosynthesis). *Plant physiology*. 102 (2): 547-552.
- Hodson, H.K., Hamner, K.C.** 1971. A comparison of the effects of autoclaved and nonautoclaved gibberellic acid on *Lemna perpusilla* 6746. *Plant physiology*. 47 (5): 726.

- Hedden, P., Phillips, A.L.** 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in plant science*, 5(12), 523-530.
- Hepler, P. K., Wayne, R. O.** 1985. Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology*, 36(1), 397-439.
- Hepler, P.K.** 2005. Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell Online*, 17(8), 2142-2155.
- Hilliard, J.H., West, S.H.** 1970. Starch accumulation associated with growth reduction at low temperatures in a tropical plant. *Science*, 168(3930), 494-496.
- Hua, J.** 2009. From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:568–573.
- Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S., Ovesná, J.** 2010. Cold stress and acclimation—what is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*.12(3): 395-405.
- Jeon, J., Kim, J.** 2013. Cold stress signaling networks in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*. 56(2): 69-76.
- Johansen D.A.** 1940 *Plant microtechnique*. McGraw, New York, USA.
- Jouve, L., Franck, T., Gaspar, T., Cattivelli, L., Hausman, J.F.** 2000. Poplar acclimatization to cold during in vitro conservation at low non-freezing temperature: metabolic and proteic changes. *Journal of Plant Physiology* 157:117-123.
- Jusaitis, M., Paleg, L.G., Aspinall, D.** 1981. Effects of temperature and gibberellic acid on phospholipid composition of *Avena sativa* stem segments. *Phytochemistry*. 20 (7): 1529-1538.
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M. R.** 1996. Cold Calcium Signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell* 8: 489-503.
- Klein, A.L.** 2000. Eugen Warming eo cerrado brasileiro: um século depois. Unesp.
- Kochba, J., button, J., Spiegel-Roy, P., Bornman, C.H., Kochaba, M.** 1974. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acids and adenini sulphate. *Annals of Botany*, London. 38: 795-802.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., Franklin, K. A.** 2009. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Current Biology*, 19(5), 408-413.
- Kurepin, L.V., Walton, L.J., Pharis, R.P., Emery, R.N., Reid, D.M.** 2011. Interactions of temperature and light quality on phytohormone-mediated elongation of *Helianthus annuus* hypocotyls. *Plant Growth Regulation*, 64(2): 147-154.

- Kurita, F.M.K.** 2011. Crescimento *in vitro* da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo.
- Kutschera, U., Niklas, K.J.** 2013. Cell division and turgor-driven stem elongation in juvenile plants: A synthesis. *Plant Science*. 207: 45–56.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia vegetal*. RiMa. São Carlos. 550 p.
- Lawn, G.** 2008. Bromeliads in hanging baskets. *Bromeliaceae* 17 (3): 9-10.
- Lichtenthaler, H.K.** 1987 Chlorophylls and Carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* 148:350-382.
- Lima, C.O.D.C., Marchi, M.N.G., Lima-Brito, A., Carneiro, C.E., Bellintan, M.C., Santana, J.R.F.D.** 2012. Direct organogenesis of *Orthophytum mucugense*. *Ciência Rural*, 42(2), 249-254.
- Lionakis S.M., Schwabe W.W.** 1984. Bud dormancy in the kiwi fruit *Actinidia chinensis* Planch. *Annals of Botany* 54, 467–484.
- Liu, C.M., Hermann, T.E.** 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *Journal of Biological Chemistry*, 253(17), 5892-5894.
- Lockhart, J.A.** 1965. Cell extension. In: J. Bonner and J. E. Varner, eds., *Plant Biochemistry*. Academic Press, New York. 826-849.
- Lorenzo-Cáceres, J.M.S.** 2004. Las plantas ornamentales y sus zonas de rustizidade España. <http://www.arrakis.es/~jmanuel/PLANTAS%20Y%20ZONAS%20DE%20RUSTICIDAD.pdf> acessado em: 20 de junho de 2007.
- Luther, H.E.** 2010. An alphabetical list of Bromeliad Binomials, 10th ed. The Bromeliad Society International, Sarasota.
- Maguire, J.D.** 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177.
- Martín, M.L., Busconi, L.** 2001. A Rice membrana-bound calcium-dependente protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiology*. 125: 1442-1449.
- Martins, J.P.R., Schimildt, E.R., Alexandre, R.S., Santos, B.R., Magevski, G.C.** 2013. Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(2): 138-146.
- Matschi, S., Werner, S., Schulze, W.X., Legen, J., Hilger, H.H., Romeis, T.** 2013. Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. *The Plant Journal*. 883-896.

- Mattiuz, B.H., Fachinello, J.C.** 1996. Enraizamento de estacas de kiwi *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) CF Liang & AR Ferguson var. Deliciosa. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 31(7), 503-508.
- McWilliam, J.R., Naylor, A.W.** 1967. Temperature and plant adaptation. I. Interaction of temperature and light in the synthesis of chlorophyll in corn. Plant physiology, 42(12), 1711-1715.
- Mendes, G.C., Soares, C.Q.G., Braga, V.F., Pinto, L.C., Santana, R., Viccini, L.F. & Peixoto, P.H.P.** 2007. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). Revista Brasileira de Biociências 5 (2): 972-974.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1995. Importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. Selbyana 16 (2): 147-149.
- Mercier, H., Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). Biotechnology in Agriculture and Forestry 40: 43-57.
- Metzger, J. D.** 1985. Role of gibberellins in the environmental control of stem growth in *Thlaspi arvense* L. Plant physiology. 78(1): 8-13.
- Minorsky P.** 1989. Temperature sensing by plants: a review and hypothesis. Plant Cell Environ 12: 119–135.
- Moll C., Jones, R.L.** 1981. Short-term kinetics of elongation growth of gibberellin-responsive lettuce hypocotyl sections. Planta 152: 442-449
- Mollo, L.** 2009. 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 de mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo.
- Mollo, L., Martins, M.C.M. Oliveira, V.F., Nievola, C.C., Rita de Cássia L.** 2011. Effects of low temperature on growth and nonstructural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 107 (1): 141-149.
- Monroy A. F. & Dhindsa, R.** 1995. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 °C. The Plant Cell 7:321-331.
- Monroy, A.F., Sangwan, V., and Dhindsa, R.S.** 1998. Low temperature signal transduction during cold acclimation: Protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. Plant J. 13: 653–660.

**Morgan, A. J., Jacob, R.** 1994. Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J*, 300, 665-672.

**Murashige, T., Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

**Nakayama, M., Yamane, H., Nojiri, H., Yokota, T., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Nonaka, M.** 1995. Qualitative and quantitative analysis of endogenous gibberellins in *Raphanus sativus* L. during cold treatment and the subsequent growth. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(6), 1121-1125.

**Nievola C.C., Kraus J.E., Freschi L., Souza B.M., Mercier H.** 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photo- synthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cell Dev-Pl* 41:832–837.

**Obroucheva, N.V.** 2008. Cell elongation as an inseparable component of growth in terrestrial plants. *Ontogenez*. 39 (1): 13-24.

**Oliveira, Á.A.G.** 2009. Aclimação da maquinaria fotossintética do cafeeiro cultivado em diferentes níveis de luz e de disponibilidade hídrica. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 40 p.

**Olszewski N., T.P. Sun, Gubler F.** 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14: 61– 80.

**Öquist G., Hurry V.M., Huner N.P.A.** 1993. Low temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant Physiol* 101:245-250

**Orlikowska, T.** 1992. Effect of *in vitro* storage at 4 °C on survival and proliferation of two apple rootstocks. *Plant Cell, tissue and organ Culture*. 31: 1-7.

**Paleg, L.G.** 1965. Physiological effects of gibberellins. *Annual Review of Plant Physiology*. 16(1): 291-322.

**Patel, D., Franklin, K. A.** 2009. Temperature-regulation of plant architecture. *Plant Signaling & Behavior*. 4(7): 577-579.

**Pedroso A., Lazarini R., Tamaki V., Nievola C.C.** 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Revista Brasil Bot.* 33:407–414.

**Pérez, A., Laudat, T., Mora, M., Carvajal, C., Aragón, C., González, J., Lorenzo, J.C.** 2013. Micropropagation of *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. for sustainable production of plant proteases. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1-13.

**Pierik, R., Millenaar, F.F., Peeters, A.J., Voeselek, L.A.** 2005. New perspectives in flooding research: the use of shade avoidance and *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 96(4), 533-540.

**Pinheiro, F., Borghetti, F.** 2003. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesbach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Shultes f.) Mez (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 17(1), 27-35.

**Proseus, T.E., Zhu, G.L., Boyer, J.S.** 2000. Turgor, temperature and the growth of plant cells: using *Chara corallina* as a model system. *Journal of experimental botany*, 51(350), 1481-1494.

**Rademacher, W.** 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual review of plant biology*, 51(1), 501-531.

**Rao, N.K.** 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3(2): 136-145.

**Rech-Filho, A.R., Dal Vesco, L.L., Nodari, R.O. Lischka, R.W., Muller, C.V. & Guerra, M.P.** 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity e Conservation* 14: 1799 – 1808.

**Reddy, A.S.N.** 2001. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Science*. 160: 381-404.

**Reitz, R.** 1983. Bromeliaceas e malária-bromélia endêmica. Itajaí. *Flora Ilustrada Catarinense*. Série 983.

**Rietveld, P. L., Wilkinson, C., Franssen, H. M., Balk, P. A., van der Plas, L. H., Weisbeek, P. J., & de Boer, A. D.** 2000. Low temperature sensing in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) is mediated through an increased response to auxin. *Journal of experimental botany*. 51 (344): 587-594.

**Rikin, A., Waldman, M., Richmond, A.E., Dovrat, A.** 1975. Hormonal regulation of morphogenesis and cold resistance. I. Modifications by abscisic acid and by gibberellic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings. *J. Exp.Bot.* 1975, 16, 175–183.

**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 e Agrotecnologia*, 28(4), 757-763

**Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D., Beebster, G. T.** 2007. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiology*. 143(3): 1429-1438.

**Ruelland, E., Vaultier, M. N., Zachowski, A., Hurry, V.** 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research*. 49: 135-150.

- Ruelland, E., Zachowski, A.** 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 225-232.
- Sachs, R.M.** 1965. Stem elongation. *Annual Review of Plant Physiology*. 16 (1): 73-96.
- Sakai W.S.** 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* 48, 247–249.
- Sajo, M.G., Castro, N.M.** 2012. Caule. In: B. Apezatto-da-Glória & S. M. Carmello – Guerreiro (eds). *Anatomia Vegetal*. 3 ed. Viçosa, UFV. 265-280.
- Sansberro, P.A., Mroginski, L.A., Bottini, R.** 2001. *In vitro* morphogenetic responses of *Ilex paraguariensis* nodal segments treated with different gibberellins and Prohexadione-Ca. *Plant growth regulation*. 34 (2): 209-214.
- Santos, D.S., Tamaki V., Nievola C.C.** 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cell Dev Biol – Plant*. 46:524–529.
- Sarkar, D., Pandey, S.K., Chanemougasoundharam, A., Sud, K.C.** 2005. The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81: 221-227.
- Sazima, I, Buzato, S. and Sazima, M.** 1995. The saw-billed hermit *Ramphodon naevius* and its flowers in southeastern Brazil. *J. Ornithol* 136: 195-206.
- Scandalios, J.G.** 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in genetics*, 28, 1-41.
- Silva, N.N., Gomes, J.M.** 2003. Bromeliaceae do Sítio Morro do Céu, Serra (ES). *Natureza on line*. 1 (2): 1-11.
- Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J., Van Montagu, M., Van Der Straeten, D.** 1997. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(6): 2756-2761.
- Smillie, R.M. Critchley, C. Bain, J.M. Nott, R.** 1978. Effect of growth temperature on chloroplast structure and activity in barley. *Plant Physiol*. 62: 191-196.
- Smith, J.A.C.** 1989. Epiphytic bromeliads. In: *Vascular Plants as Epiphytes*. U. Lüttge Springer-Verlag. Damstadt: 109-134.
- Smith, L.B., Downs, R.J.** 1979 . Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Flora Neotropica* 14: 1493 – 2142.
- Stamm, P., Kumar, P.P.** 2010. The phytohormone signal network regulating elongation growth during shade avoidance. *Journal of experimental botany*, 61(11), 2889-2903.

- Stavang J.A., Lindgard B., Erntsen A., Lid S.E., Moe R., Olsen J.E.** 2005. Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiol* 138: 2344–2353.
- Stavang, J. A., Junttila, O., Moe, R., Olsen, J.E.** 2007. Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea. *Journal of experimental botany*, 58(11), 3061-3069.
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., Blázquez, M.A.** 2009. Hormonal regulation of temperature-induced growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 60(4): 589-601.
- Stehmann, J. R., Forzza, R.C., Salino, A., Sobral, M, Costa, D.P, Kamino, L.H.Y.** 2009. *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 516 p.
- Stuart, N.W., Cathey, H.M.** 1961. Applied aspects of the gibberellins. *Annual Review of Plant Physiology*, 12(1), 369-394.
- Sun, T. P., Gubler, F.** 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* (55): 197-223.
- Taiz, L., Zeiger, E.** 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5a Ed. Porto Alegre, Artmed. 954p.
- Takane, R.J., Minami, K., Lucchesi, A.A., DE ALMEIDA, M.** 1994. Influência do cloreto de cálcio no crescimento de explantes de *Gypsophila paniculata* L.(Caryophyllaceae), cultivados *in vitro*. *Sci. agric.(Piracicaba, Braz.)*, 51(2).
- Tamaki, V., Mercier, H. Nievola, C.C.** 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar ‘Smooth Cayenne’ em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34 (1): 69-73.
- Toledo-Aceves, T., Wolf, J. H.** 2008. Germination and establishment of *Tillandsia eizii* (Bromeliaceae) in the canopy of an oak forest in Chiapas, Mexico. *Biotropica*, 40(2): 246-250.
- Tsukaya, H.** 2005. Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *International Journal of Developmental Biology*. 49(5/6): 547.
- Vieira, D. C. M., Socolowski, F., Takaki, M.** 2007. Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. *Revista Brasileira de Botânica*. 30 (2): 183-188.
- Villa, F., Pasqual, M., Assis, F.A., Pio, L.A.S., Assis, G. A.** 2008. *Crescimento in vitro* de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. *Ciênc. agrotec., Lavras*. 32: (6): 1754-1759.
- Vince-Prue, D.** 1977. Photocontrol of stem elongation in light-grown plants of *Fuchsia hybrida*. *Planta*, 133(2): 149-156.

**Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., Matsuoka, M.** 2007. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 183-198.

**Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R.** 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223.

**Went, F.W.** 1953. The effect of temperature on plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 4(1), 347-362.

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

**Xu, Y.L., Li, L., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.** 1999. Feedback regulation of GA5 expression and metabolic engineering of gibberellin levels in Arabidopsis. *Plant Cell* 11: 927–936

**Yamaguchi, S., Kamiya, Y.** 2000. Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant and Cell Physiology*, 41(3): 251-257.

**Yamaguchi, S.** 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 225-251.