



Influência da temperatura no desenvolvimento de segmentos nodais micropropagados de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch (Bromeliaceae)

Daniela Soares dos Santos^(1,2) & Catarina Carvalho Nievola⁽²⁾

⁽¹⁾Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, *strobilacea@gmail.com*; ⁽²⁾Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica.

Resumo: Eficiente protocolo de micropropagação foi estabelecido para essa espécie a partir da utilização de segmentos nodais como explantes para obtenção de plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch que é uma bromélia ornamental de ampla distribuição, descrita nos domínios de Cerrado e Mata Atlântica está exposta a diferentes condições térmicas, o que indica a adaptação à variedade de ambientes. Contudo, não foram encontrados relatos sobre a influência da temperatura sobre o desenvolvimento da gema lateral existente no segmento nodal durante a micropropagação, bem como o desenvolvimento inicial das plantas. Este trabalho visa avaliar o efeito de diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25 e 30 °C) sobre a formação de novas plantas e alongamento do eixo caulinar. Foram utilizados segmentos nodais isolados do eixo caulinar alongado de plantas cultivadas *in vitro*. Estes foram depositados em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) modificado, sendo mantidos sob tratamento térmico de 10, 15, 20, 25 e 30 °C em fotoperíodo de 12h. Após 90 dias, observou-se inibição total do desenvolvimento da gema lateral somente nos nós mantidos a 10 °C, a partir dos quais não foi possível obter-se plantas nessa temperatura. Plantas crescidas a uma temperatura de 15 °C apresentaram uma redução no crescimento quando comparadas àquelas que permaneceram no mesmo período a 20, 25 e 30 °C. Plantas mantidas à temperatura de 30 °C apresentaram um alongamento do eixo caulinar maior em relação as plantas desenvolvidas nas demais temperaturas estudadas. Portanto, verificou-se que o desenvolvimento das plantas *A. strobilacea* a partir de segmentos nodais é possível em temperaturas iguais ou superiores a 15 °C constantes o que indica a plasticidade às variações térmicas e a resistência dessa espécie à temperatura baixa.

Palavras-Chave: Preservação, *in vitro*, crescimento.

INTRODUÇÃO

Muitos membros de Bromeliaceae ocupam ambiente cujas condições de temperatura podem ser consideradas estressantes, tais como estabelecimento sobre rochas ou como epífitas no dossel de árvores (Benzing 2000). 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).

A ampla distribuição de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch (Silva & Gomes 2003) pode indicar adaptações às diferentes temperaturas. Essa espécie ocorre 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). Paraguai e Uruguai (Reitz 1983).

A. strobilacea possui folhas finas e acanaladas que podem atingir até 2 metros de comprimento (Reitz 1983), e por isso são procuradas para cultivos em cestos suspensos com a finalidade de ornamentação (Lawn 2008), resultando em redução da espécie em seu ambiente natural devido ao extrativismo ilegal e também devido à retirada das árvores que servem de suporte para ela (Figueiredo 2003).

Um protocolo de cultivo *in vitro* dessa bromélia foi estabelecido por Santos *et al.* (2010), por meio do qual é possível obter cerca de 80 plantas em um ano a partir de uma única semente. Para isso, segmentos nodais isolados do eixo caulinar alongado de plantas de *A. strobilacea* micropropagadas são cultivados *in vitro*. Esse protocolo pode contribuir para a redução da procura por exemplares provenientes do ambiente natural, além de produzir um número substancial de clones de plantas para serem utilizadas em experimentos cujo objetivo é

verificar aspectos fisiológicos desta bromélia, uma vez que reduz variabilidade genética, diminuindo interferências na análise final dos resultados (Burr & Tinus 1996).

O efeito da temperatura é frequentemente associado ao aumento ou diminuição do crescimento dos vegetais (Taiz & Zeiger 2008) e pode influenciar em alguns aspectos morfológicos da planta, durante o seu cultivo em temperaturas altas ou baixas (Pedroso *et al.* 2010).

Em certas espécies de bromélias, a indução do desenvolvimento de gemas vegetativas axilares presentes nos segmentos nodais ocorre em geral a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Mendes *et al.* 2007, Santos *et al.* 2010), contudo não foram encontrados estudos que mostram a influência da temperatura no desenvolvimento destas gemas presentes nos segmentos nodais de bromélias cultivadas *in vitro*.

Este trabalho tem por objetivo a avaliação da influência da temperatura sobre o desenvolvimento da gema lateral presente nos segmentos nodais de *A. strobilacea* cultivada *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *A. strobilacea* foram coletadas de plantas da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu. O cultivo *in vitro* foi estabelecido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica. A micropropagação foi iniciada por meio da desinfestação das sementes onde as mesmas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial acrescido de 2 gotas de Tween 20[®] mantidas sob agitação por 20 minutos. Foram transferidas para uma solução aquosa de HCl 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[®] por 1 hora sob agitação. Após esse período, as sementes foram distribuídas em frascos de 250 ml contendo 40 mL de meio nutritivo formulado por Murashige e Skoog (1962) com concentração de macronutrientes diluídos a um quinto em relação à formulação original (MS/5), acrescido de sacarose a 2 %, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 0,1 mg L⁻¹ de tiamina. O pH foi ajustado para 5,8 e geleificado com agar (6 g L⁻¹) e submetido à esterilização em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Os frascos foram mantidos sob temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 14 μmol

m² s⁻¹ (condição indutora de alongamento do eixo caulinar) fornecida por lâmpadas fluorescentes, permanecendo nestas condições durante 2 meses. Após a germinação das sementes e alongamento do caule, os segmentos nodais foram isolados e depositados em frascos contendo MS/5 e mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 $\mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$, nas diferentes temperaturas: 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C. Foram utilizados 4 frascos contendo 15 segmentos nodais cada, para cada temperatura, em cada uma das quatro repetições.

Análise estatística

As médias foram calculadas e submetidas a análise de variância, sendo comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados indicaram que a temperatura de 10° C inibiu o desenvolvimento da gema lateral. Contudo, quando transferidos para temperatura de 26 °C esta se desenvolveu, originando a nova planta o que indica que não houve dano ao tecido vegetal devido à exposição a 10 °C. Esse resultado mostra a possibilidade de armazenamento do explante por um período de 4 meses nessa temperatura. Já aqueles cultivados *in vitro* a 15 °C desenvolveram plantas cujo crescimento foi significativamente menor quando comparadas àquelas provenientes dos tratamentos térmicos de 20, 25 e 30 °C, mostrando uma influência da temperatura sobre crescimento da planta.

A tabela 1 mostra que o desenvolvimento da gema do segmento nodal dessa bromélia cultivado em 30 °C foi observado aos 15 dias e quando cultivado em 15 °C surgiu apenas aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Resultados semelhantes sobre a influência da temperatura baixa foram observados por Mollo *et al.* (2011) que avaliou a germinação de sementes de plantas da bromélia *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* em diferentes temperaturas. Essa autora constatou que a temperatura menor atuou retardando a germinação, pois sementes a 30 °C germinaram em 14 dias e outras mantidas a 15 °C germinaram em 50 dias.

Maior alongamento do caule de *A. strobilacea* foi observado nas plantas provenientes do cultivo *in vitro* de nós a 30 °C. Penfiel (2008), afirma que altas temperaturas induzem o alongamento de hipocótilos e pecíolos.

Plantas originárias dos segmentos nodais cultivados *in vitro* a 15 °C apresentaram uma redução no crescimento de *A. strobilacea*. Resultado



semelhante foi encontrado por Nievola *et al.* (2005), no cultivo de abacaxizeiro, onde foi observado uma redução no crescimento das plantas cultivadas em termoperíodo de 28 °C dia e 15 °C noite em comparação àquelas mantidas em temperatura constante de 28 °C. Pedroso *et al.* (2010), estudando a bromélia *Vriesea inflata* cultivada *in vitro* a 15 e 28 °C, observaram que plantas cultivadas na temperatura mais baixa foram menores quando comparadas com as plantas cultivadas a 28 °C, demonstrando assim a influência da baixa temperatura sobre a redução do crescimento, sem alteração da sobrevivência, indicando a resistência ao frio.

A tabela 2 mostra que plantas cultivadas em temperaturas superiores ou iguais a 20 °C apresentaram maior quantidade de folhas em relação às plantas cultivadas em 15 °C. Tamaki *et al.* 2002 observaram um aumento linear no número de folhas de *Hordeum vulgare* L. até aproximadamente 22 °C onde a partir desta temperatura o aumento foi constante, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação com temperatura controlada.

Plantas de *A. strobilacea* cultivadas a 30 °C apresentaram quantidade de massa fresca da parte aérea menor em relação às demais temperaturas estudadas (tabela 2). Resultados semelhantes foram observados com algodão (*Gossypium hirsutum*) onde as plantas cultivadas em alta temperatura apresentaram massa menor em relação àquelas cultivadas em baixas temperaturas noturnas (Roussopoulos *et al.* 1998).

Lionakis e Schwabe (1984) observaram menor acúmulo de massa seca da parte aérea de plantas *Actinidia chinensis* (Kiwi) cultivadas a 15 °C similar ao observado para *A. strobilacea*. Contudo, esses autores constataram que temperatura de 20 °C foi 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 (tabela 2). As diferenças encontradas entre *A. chinensis* e *A. strobilacea* pode ser atribuído ao fato de que *A. chinensis* é uma planta típica de clima temperado (Mattiuz & Fachinello 1996).

Went (1953) já relatava que temperaturas ótimas para o crescimento de partes da planta são, em geral, 25 °C ou mais. Esse resultado foi também observado *A. strobilacea* cultivada *in vitro*.

A redução do crescimento da planta por diminuição da temperatura é uma técnica que tem sido aplicada em programas de conservação como, por exemplo, para formação de coleções *in vitro* cultivando plantas em temperaturas inferiores a 25° C (Hua 2009). Já o aumento da temperatura induz aumento no crescimento desejável aos métodos de multiplicação de plantas (Penfield 2008). Nesse sentido, a plasticidade observada neste trabalho para *A. strobilacea* indica ser possível a utilização da micropropagação seja para produção de mudas como para formação de coleções visando a preservação.

CONCLUSÕES

A. strobilacea apresenta plasticidade fenotípica quando cultivadas em diferentes temperaturas, indicando tolerância ao frio por sobreviverem satisfatoriamente a 15° C apresentando apenas redução no crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Capes a bolsa concedida para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Tiss Organ Cult.* 99: 233–238.
- Benzing, D.H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K.
- 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.
- 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.
- Hua, J. 2009. From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:568–573.
- Lawn, G. 2008. Bromeliads in hanging baskets. *Bromeliaceae* 17 (3): 9-10.
- Lionakis, S.M. & Schwabe, W.W. 1984. Some effects of daylength, temperature and exogenous growth regulator application on the growth of *Actinidia chinensis* Planch. *Annals of Botany* 54: 485-501.
- Mattiuz, B. & Fachinello, J.C. 1996. Enraizamento de estacas de Kiwi *Actinidia deliciosa* (A. chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson var. *deliciosa*. *Pesq. Agropec. Bras.* 31 (7): 503-508.
- 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.
- Mollo, L., Martins, M. C. M., Oliveira, V. F. O. & Figueirredo-Ribeiro, R. C. L.** 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult. [on line - acesso: 30.08.2011] <http://www.springerlink.com/content/n35309pgu7382057/fulltext.pdf>
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B. M. & Mercier, H.** 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. In Vitro Plant Cellular & Developmental Biology 41: 832-837.
- Pedroso, A.N.V., Lazarini, R.A.M., Tamaki, V. & Nievola, C.C.** 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimation of *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra an ornamental bromeliad. Revista Brasileira de Botânica 33 (3): 407-414.
- Penfield, S.** 2008. Temperature perception and signal transduction in plants. New Phytologist 179: 615-628.
- Reitz, R.** 1983. Bromeliaceae e malária-bromélia endêmica. Itajai. Flora Ilustrada Catarinense. Serie 983.
- Roussopoulos, D., Liakatas, A. & Whittington, W. J.** 1998. Cotton responses to different light-temperature regimes. *Journal of Agricultural Science* 131: 277-283.
- Santos, D.S., Tamaki, V. & Nievola, C.C.** 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch via nodal segments. In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant 46: 524-529.
- Silva N.N.F. & Gomes J.M.L.** 2003. Bromeliaceae do Sítio Morro do Céu, Serra (ES). Natureza on line 1(2): 1-11.
- Stehmann, J.R., Forzza, R.C., Salino, A., Sobral, M., Costa, D.P. & Kamino, L.H.Y.** (ed.) Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 516 p.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2008. Fisiologia Vegetal. 4a Ed. Porto Alegre, Artmed.
- Tamaki, M., Kondo, S. & Itani, T.** 2002. Temperature responses of leaf emergence and leaf growth in barley. *Journal of Agricultural Science* 138: 17-20.
- Went, W.** 1953. The effect of temperature on plant growth. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 4: 347-362.

Tabela 1 – Desenvolvimento da gema lateral ao longo de 60 dias de cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *A. strobilacea* em diferentes temperaturas.

Temperatura	Desenvolvimento da gema lateral			
	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
10 °C	-	-	-	-
15 °C	-	-	-	X
20 °C	-	X	X	X
25 °C	-	X	X	X
30 °C	X	X	X	X

x indica presença de gema lateral de *A. strobilacea*

Tabela 2 – Número de folhas, comprimento da folha, número de nós, distância entre os nós, massa fresca e seca da parte aérea produzida por planta provenientes do cultivo *in vitro* de segmentos nodais a 15, 20, 25 e 30 °C após 90 dias de transferência para o meio de cultivo.

Temperatura	Número de folhas (un)	Comprimento da folha (cm)	Número de nós (un)	Distância entre os nós (cm)	Parte aérea	
					Massa fresca (g)	Massa seca (g)
15 °C	0.2 c	0.1 b	0 c	0 c	0.032 c	0.002 c
20 °C	4 b	7.4 a	3.2 b	2.1 b	0.119 ab	0.007 b
25 °C	5.8 a	6.7 a	3.8 b	2.8 b	0.164 a	0.010 a
30 °C	6.1 a	6.5 a	5.0 a	5.8 a	0.100 b	0.008 b

Letras diferentes na vertical indicam diferenças significativas pelo teste Tukey em nível de 5%.