

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ELIZANGELA RODRIGUES SANTOS

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS DE *Billbergia
zebrina* Lindl. (BROMELIACEAE) EM FUNÇÃO DE FONTES E
CONCENTRAÇÕES DE CARBOIDRATOS DURANTE O CULTIVO
IN VITRO CONVENCIONAL

VITÓRIA - ES

2018

ELIZANGELA RODRIGUES SANTOS

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS DE *Billbergia zebrina* Lindl. (BROMELIACEAE) EM FUNÇÃO DE FONTES E CONCENTRAÇÕES DE CARBOIDRATOS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* CONVENCIONAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto

Coorientador: Dr. João Paulo Rodrigues Martins

VITÓRIA - ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Humanas e Naturais da
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Saulo de Jesus Peres – CRB-6 ES-000676/O

S237r Santos, Elizangela Rodrigues, 1993-
Respostas fisiológicas e anatômicas de *Billbergia zebrina*
Lindl. (Bromeliaceae) em função de fontes e concentrações de
carboidratos durante o cultivo in vitro convencional / Elizangela
Rodrigues Santos. – 2018.
59 f. : il.

Orientador: Antelmo Ralph Falqueto.

Coorientador: João Paulo Rodrigues Martins.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Bromeliacea – Propagação in vitro. 2. Plantas –
Anatomia. 3. Fisiologia vegetal. 4. Fotossíntese. 5. Clorofila. I.
Falqueto, Antelmo Ralph, 1979-. II. Martins, João Paulo
Rodrigues, 1984-. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

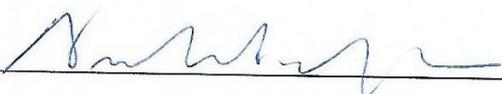
Elizangela Rodrigues Santos

“Respostas fisiológicas e anatômicas de *Billbergia zebrina* Lindl. (Bromeliaceae) em função de fontes e concentrações de carboidratos durante o cultivo *in vitro* convencional”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

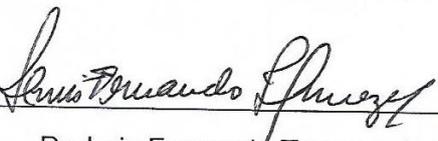
Aprovada em 30 de julho de 2018.

Comissão Examinadora:



Dr. Antelmo Ralph Falqueto

Orientador e Presidente da Comissão – UFES



Dr. Luis Fernando Tavares de Menezes

Membro Titular Interno – UFES



Dr. Edilson Romais Schildt

Membro Titular Externo – UFES

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, a minha mãe Eva, meu irmão Oseias e toda a minha família.”

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), por me proporcionar um ambiente criativo e coletivo para os estudos. Sou grata ao programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal pela formação, a cada membro do corpo docente e a coordenação;

Ao laboratório de Ecofisiologia Vegetal e ao laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais;

Ao laboratório de Biologia Estrutural pelo apoio na anatomia e pela a gentileza.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

Ao professor Antelmo Ralph Falqueto responsável pela orientação desse trabalho, pelo apoio e pela confiança;

À João Paulo Rodrigues Martins pelo apoio em cada etapa da pesquisa e pela contribuição com as revisões do conteúdo. Pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por incentivar a superação dos meus limites. Pela infinita disponibilidade, paciência e todos os ensinamentos;

À Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo e Luiz Carlos de Almeida Rodrigues pelo suporte;

À Helaine Família Oliveira, Bianca Gomes Batista, Lorenzo Toscano Conde, Priscila da Conceição de Souza Braga colegas de laboratório pela assistência. Thayna dos Santos Silva pela ajuda e apoio emocional na anatomia.

Às minhas amigas Bianca Barbosa Barcellos, Huslana Quartezone Segantini, Renara Nichio Amaral e Taynara Muniz pelo carinho, companheirismo, incentivo, sem vocês eu teria enlouquecido;

À minha mãe, Eva Rodrigues de Oliveira, que sempre foi minha maior fonte de inspiração e força. Ao meu irmão Oseias Rodrigues Santos e familiares por acreditarem e apoiarem meu sonho.

Meu mais sincero agradecimento.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Curvas de indução rápida da fluorescência transiente da clorofila *a* e fluorescência variável (F_V) (A, B e C); Fluorescência relativa variável entre F_0 e F_M (V_{OP}) e fluorescência relativa variável no ponto J em função de carboidratos (g L^{-1}) no cultivo *in vitro* (D, E e F). Nos gráficos de coluna, médias seguidas (\pm DP) pela mesma letra para F_V e V_J não são significativamente diferentes entre as concentrações de acordo com o teste Scott-Knott, a 5%. Para cada carboidrato, médias seguidas (\pm DP) por asterisco são diferentes significativamente de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.31
- Figura 2: Diferenças cinéticas da fluorescência variável relativa evidenciando o aparecimento da banda L [$\Delta V_{OK} = V_{OK \text{ tratamento}} - V_{OK \text{ controle}}$] (A, B e C); banda K [$\Delta V_{OJ} = V_{OJ \text{ tratamento}} - V_{OJ \text{ controle}}$] (D, E e F). O tempo está representado em escala logarítmica (ms).32
- Figura 3: Modelos de fluxos fenomenológicos de energia por seção transversal em folhas de *B. zebrina* aos 55 dias em função de fontes e concentrações de carboidratos. ABS / CS_M - fluxo de absorção por seção transversal, TR_0 / CS_M - fluxo de energia capturada por seção transversal, ET_0 / CS_M - fluxo de transporte de elétrons por CS, DI_0 / CS_M - fluxo de energia dissipada por CS_M . CS_M / ABS - os centros de reação ativos (RCs) são indicados por círculos pretos. Em cada parâmetro, médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para fonte de carboidrato e caixa baixa para concentração de carboidrato, não são significativamente diferentes de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.33
- Figura 4: Seções paradérmicas das diferentes regiões foliares de *B. zebrina* aos 55 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações (0, 15, 30 ou 45 g L^{-1}) de frutose, glicose ou sacarose. Barra = $100 \mu\text{m}$35
- Figura 5: Seções transversais de folhas de *B. zebrina* aos 55 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações (0, 15, 30 ou 45 g L^{-1}) de frutose, glicose ou sacarose. Barra = $50 \mu\text{m}$36
- Figura 6: Diâmetro dos vasos do xilema (A) e densidade de vasos xilemáticos (B) em função de concentrações e fontes de carboidratos. Médias seguidas (\pm DP) pela mesma letra, maiúscula em cada nível de concentração e minúscula em

função do tipo de carboidrato, não diferem entre si de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.37

Figura 7: Massa fresca (mg / planta) de plantas de *B. zebrina* cultivadas *in vitro* em função de concentrações e fontes de carboidratos. Médias seguidas (\pm DP) pela mesma letra, maiúscula em cada nível de concentração e minúscula em função do tipo de carboidrato, não diferem entre si de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos parâmetros do teste JIP com base em CHEN <i>et al.</i> , (2016) e GOLTSTEV <i>et al.</i> , (2016).....	28
Tabela 2: Taxa líquida de fechamento dos centros de reação do FSII (M_0) e rendimento quântico com base na cinética de emissão de fluorescência em função de concentrações de carboidratos.....	34
Tabela 3: Densidade estomática (0.1 mm^2) em folhas de <i>B. zebrina</i> em função da concentração de carboidrato (g L^{-1}) suplementado no meio de cultura.....	36

RESUMO

Quando propagados *in vitro*, os explantes recebem todos os nutrientes necessários para o seu crescimento, incluindo a fonte de carboidrato através do meio de cultura. No entanto, não é bem entendido como a fonte e a concentração de carboidrato podem afetar a funcionalidade do aparelho fotossintético (principalmente do fotossistema-FSII) dessas plantas. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas e anatômicas de *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) em função de fontes e concentrações de carboidratos durante o cultivo *in vitro*. Brotos laterais de plantas previamente estabelecidas e multiplicadas *in vitro* foram individualizados e transferidos para frascos de 268 mL com 50 mL de meio MS contendo frutose, glicose e sacarose em quatro concentrações (0, 15, 30 e 45 g L⁻¹). Após 55 dias de cultivo, foi avaliada a fluorescência transiente da clorofila *a*, a análise anatômica da folha e a análise de crescimento. As condições *in vitro* influenciaram o desempenho fotossintético e anatômico de plantas de *Billbergia zebrina*. O intervalo de concentração entre 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose não acarretou grandes mudanças no desempenho do aparato fotossintético e na anatomia das plantas, mostrando-se mais eficiente. A concentração e o tipo de carboidrato empregado durante o cultivo *in vitro* não diminuí o desempenho do aparato fotossintético. Quando cultivadas nas concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ independente do carboidrato utilizado as plantas apresentaram maior densidade estomática. A suplementação do meio de cultura com monossacarídeos provocou alterações no desenvolvimento dos vasos do xilema, como o aumento no número e no diâmetro dos vasos, permitindo a adequação às condições microambientais. O incremento da massa fresca foi verificado em função do aumento da concentração de carboidratos adicionados no meio, seguida de decréscimo quando cultivadas com 45 g L⁻¹ (glicose e sacarose).

Palavras-chave: Bromeliacea • clorofila • fisiologia vegetal • fotossíntese • propagação *in vitro*.

ABSTRACT

When propagated *in vitro*, the explants receive all the nutrients necessary for their growth, including the carbohydrate source through the culture medium. However, it is not well understood how the carbohydrate source and concentration may affect the functionality of the photosynthetic apparatus (mainly photosystem-PSII) of these plants. The objective of this study was to evaluate the physiological and anatomical responses of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) as a function of sources and concentrations of carbohydrates during *in vitro* culture. Lateral shoots of preestablished and *in vitro* multiplied plants were individualized and transferred to 268 ml flasks with 50 ml of MS medium containing fructose, glucose and sucrose in four concentrations (0, 15, 30 and 45 g L⁻¹). After 55 days of cultivation, transient chlorophyll *a* fluorescence, anatomical leaf analysis and growth analysis were evaluated. The *in vitro* conditions influenced the photosynthetic and anatomical performance of plants of *Billbergia zebrina*. The concentration range between 15 and 30 g L⁻¹ of sucrose did not cause major changes in the performance of the photosynthetic apparatus and in the anatomy of the plants, proving to be more efficient. The concentration and type of carbohydrate used during *in vitro* culture does not diminish the performance of the photosynthetic apparatus. When grown at concentrations of 15 and 30 g L⁻¹ independent of the carbohydrate used, the plants presented higher stomatal density. Supplementation of the culture medium with monosaccharides caused alterations in the development of xylem vessels, such as the increase in number and vessel diameter, allowing adaptation to microenvironmental conditions. The increase of the fresh mass was verified as a result of the increase of the carbohydrate concentration added in the medium, followed by a decrease when grown with 45 g L⁻¹ (glucose and sucrose).

Keywords: Bromeliacea • chlorophyll • plant physiology • photosynthesis • propagation *in vitro*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Aspectos gerais de Bromeliaceae.....	15
2.2 Aspectos gerais de <i>Billbergia zebrina</i>	16
2.3 Cultura de tecidos vegetais.....	17
2.4 Carboidratos	19
2.5 Fluorescência da clorofila a	23
2.6 Anatomia vegetal	25
3. OBJETIVO GERAL	26
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 Material vegetal, condições de cultivo, estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i>	26
5.2 Condição de cultivo <i>in vitro</i>	27
5.3 Fluorescência da clorofila a	27
5.4 Análise anatômica da folha.....	29
5.5 Análise de crescimento.....	29
5.6 Análise estatística.....	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Fluorescência transiente da clorofila a.....	30
6.2 Análise anatômica da folha.....	34
6.3 Análise de crescimento.....	37
8. CONCLUSÃO	44
9. REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

Os métodos convencionais de propagação *in vitro* demandam a utilização de ambientes selados. Dessa forma, não é possível a troca de CO₂ como ocorre em condições naturais, a umidade relativa dentro dos frascos é alta e a luminosidade é baixa (ECKSTEIN *et al.*, 2012). Essas características geram baixa atividade fotossintética, uns dos principais fatores limitantes para a melhoria da eficiência da micropropagação (YASEEN *et al.*, 2013). No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, ou seja, não produzem totalmente sua fonte energética, precisando, conseqüentemente, de uma fonte exógena de carboidratos (FARIA *et al.*, 2006).

Os carboidratos adicionados ao meio de cultura exercem um papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento *in vitro* das plantas e podem afetar a qualidade das plantas micropropagadas, bem como seu estado fisiológico. Suas funções são essenciais para o metabolismo intermediário e respiratório, além de serem substrato para sintetizar hidratos de carbono complexos tais como amido e celulose (SMEEKENS, 2000). Cada carboidrato desempenha função distinta, podendo influenciar de maneira diferente, dependendo da espécie de planta estudada.

Martins *et al.*, (2016b) verificaram que a bromélia *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley, quando cultivada *in vitro*, aparentemente libera enzimas invertases no meio de cultura para clivar sacarose em frutose e glicose, essa clivagem reduziu o potencial hídrico do meio de cultura. Quantificação de carboidratos mostrou que esses monossacarídeos foram acumulados nas raízes e na parte aérea. Foi sugerido nesse estudo que o acúmulo de carboidrato solúvel, provavelmente facilitaria o fluxo de água do meio de cultura para as plantas. Também foi analisado o teor de clorofila e a quantificação do ácido málico nas folhas, ambos relacionados à fotossíntese. Portanto, esse estudo trouxe algumas perguntas relacionadas à como cada carboidrato (frutose, glicose e sacarose) poderia de fato influenciar o desempenho fotossintético e a anatomia de plantas dessa espécie.

Os carboidratos em geral são conhecidos por reprimir a expressão de genes envolvidos na fotossíntese e por diminuir a acumulação de clorofila (GASPAR *et al.*, 2002; ROLLAND *et al.*, 2006). A sacarose pode ter efeitos de

feedback negativo sobre a fotossíntese, reduzindo a quantidade e a atividade da Rubisco (BADR *et al.*, 2011; 2015). No entanto, existem estudos que mostraram que o carboidrato exógeno melhorou o desempenho fotossintético de plantas *in vitro* (TICHA *et al.*, 1998; ECKSTEIN *et al.*, 2012; SAEZ *et al.*, 2016).

O carboidrato exógeno além de melhorar o desempenho fotossintético de algumas plantas *in vitro* pode melhorar também no processo de aclimatização *ex vitro* (TICHA *et al.*, 1998; FUENTES *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2008; CHU *et al.*, 2010; BADR *et al.*, 2015; LEMBRECHTS *et al.*, 2017). Isso se deve ao aumento do estoque de carboidrato endógeno como amido, sacarose, frutose e glicose que são utilizados como fonte de energia por plantas micropropagadas (VAN *et al.*, 1998; JO *et al.*, 2009; BADR *et al.*, 2015).

Os carboidratos usados durante o cultivo *in vitro* podem afetar tanto a morfologia / anatomia quanto a fisiologia de bromélias (MARTINS *et al.*, 2015c, 2016a, 2016b), pois as condições ambientais podem interferir nos caracteres morfológicos e anatômicos de plantas. Estudos anatômicos em plantas micropropagadas é uma ótima ferramenta para verificar como as condições *in vitro* podem afetar o sucesso de todos os estágios de micropropagação, incluindo a transferência para condições *ex vitro* (MOHAMED E ALSADON 2010, STEFANOVA *et al.*, 2011, MARTINS *et al.*, 2015, EBURNEO *et al.*, 2017).

Estudos também mediram a fluorescência da clorofila *a* para determinar o desempenho do aparelho fotossintético de plantas *in vitro* (DOBRÁNSZKI e DRIENYOVSZKI, 2014; MATYSIAK e GABRYSZEWSKA, 2016; ROSA *et al.*, 2018). Essas medidas de fluorescência tornam-se uma importante ferramenta para os estudos de fisiologia de plantas, pois se trata de um método não destrutivo, sensível, rápido e de alta aplicabilidade em condições de campo e de laboratório. Até agora, não está claro como os carboidratos empregados no meio de cultivo, podem influenciar a anatomia e o desempenho do aparelho fotossintético (principalmente do FSII) de plantas propagadas *in vitro*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas e anatômicas de *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) em função de fontes e concentrações de carboidratos durante o cultivo *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais de Bromeliaceae

A família Bromeliaceae é muito numerosa e diversificada, compreendendo 51 gêneros e 3.474 espécies descritas no mundo (CHRISTENHUSZ e BYNG, 2016). No Brasil, as bromélias são representadas por 44 gêneros e 1.343 espécies, amplamente distribuídas por todos os Domínios e tipos de vegetação (BFG, 2015). Distribui-se pelo Chile e Argentina, na América do Sul, Caribe e América Central, chegando a alcançar o México e o Sudeste norte americano, sendo assim neotropical. Com exceção de uma única espécie encontrada na África, *Pitcairnia feliciana* (A. Chevalier) Harms & Milbraed (JACQUES-FÉLIX, 2000). A família é tradicionalmente dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, classificadas de acordo com as características dos frutos, sementes e hábito de vida (BENZING, 2000).

Cerca da metade das bromélias possuem o hábito de vida epifítico, podendo apresentar hábito de vida terrícola, e rupícula (BENZING, 2000). Nas plantas epífitas nem sempre as raízes desempenham o papel de absorção, tendo na maioria das vezes função apenas de fixação. Dessa forma a folha desempenha o papel de absorção de água e nutrientes, pois apresentam tricomas que podem estar presentes em ambas as faces da epiderme (BENZ *et al.*, 2006). Além da função de absorção, os tricomas podem refletir a luz em excesso contribuindo na proteção contra fotoinibição (BENZING, 2000).

As bromélias possuem folhas com parênquima de armazenamento de água formado por células sem clorofila e com paredes finas (MARTINS *et al.*, 2014). Esse parênquima é responsável pela manutenção hídrica e proteção da região de clorofila contra a luz intensa, assim favorecendo o processo fotossintético (BRIGHIGNA, 1984). Outra forma de manutenção hídrica é o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM), especialização fisiológica que permite minimizar a perda de água por transpiração, pois essas plantas abrem seus estômatos à noite estocando CO₂ para no dia seguinte com os estômatos fechados realizarem o processo fotossintético (LÜTTGE, 2004). Plantas CAM são geralmente encontradas em ambientes com estresse hídrico (CRAYN *et al.*, 2004).

Na subfamília Bromelioideae 90% das espécies possuem fotossíntese CAM (CRAYN *et al.*, 2004). Em Tillandsioideae, grupo que é composto em sua

maioria por plantas epífitas, o metabolismo CAM aparece em todos os seus representantes (MARTIN, 1994), enquanto que em Pitcairnoideae, onde os representantes são terrestres predomina o metabolismo C₃. Há plantas que dependendo do nível de suprimento de água podem realizar o metabolismo C₃ ou CAM (PEREIRA *et al.*, 2013).

A morfologia das bromélias propicia a interação com micro e macroorganismos, suas folhas distribuídas em roseta e geralmente com bainha alargada na base formam um reservatório de água e nutrientes, além da utilização como abrigo e para reprodução por diversos organismos, como algas, bactérias, anfíbios, répteis e insetos, sendo inclusive o único ambiente onde algumas espécies podem sobreviver (SCHUTTZ *et al.*, 2012; BENZING, 2000; LEROY *et al.*, 2015).

As diferentes condições ambientais levaram as bromélias a desenvolver formas variadas, frutos, folhas e flores. A bromélia mais conhecida e de maior importância econômica, é a da espécie *Ananas comosus* (L.) Merrill, conhecido popularmente como abacaxi, com seu sabor característico é muito usado na produção de bebidas, doces e sobremesas (MOREIRA *et al.*, 2006).

O uso etnobotânico também apresenta valor econômico, principalmente em usos medicinais, alimentares e místicos (BENNETT, 2000). A *Neoglaziovia variegata* (Arr Cam) Mez, além de ser usada na medicina natural, tem importante valor econômico, utilizada como produtora de fibras (MOREIRA *et al.*, 2006).

A autêntica beleza das folhas e flores das bromélias vem estimulando sua extração para fins ornamentais. Os gêneros mais utilizados como plantas ornamentais são: *Aechmea*, *Alcantarae*, *Bromelia*, *Billbergia* entre outros (LORENZI e MATOS, 2008). Essa extração desenfreada vem ameaçando algumas espécies à extinção (NEGRELLE *et al.*, 2012).

2.2 Aspectos gerais de *Billbergia zebrina*

Billbergia zebrina (Herbert) Lindley é uma espécie da Família Bromeliaceae e da subfamília Bromelioideae, pertencente ao gênero *Billbergia* Thunb composto por cerca de 64 espécies e 36 infraespécies (BFG, 2015). É distribuída da América Central ao sul da América do Sul (SMITH e DOWNS, 1979) e a Mata Atlântica é o centro de diversidade desse gênero (BARROS e COSTA, 2008).

A distribuição de *B. zebrina* ocorre nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, na Mata Atlântica, florestas de Restinga, Cerrado e rochas, até 1.100m altitude. Sua distribuição é internalizada ao sul para o Paraguai e Argentina (BARROS e COSTA, 2008).

B. zebrina é uma espécie epifítica, com cerca de 70 cm de altura, as folhas são dispostas em roseta tubular e possui coloração verde-escura e com listras transversais branco-zebradas na face inferior; a inflorescência é do tipo espiga pendente (REITZ, 1983).

Como as técnicas de cultura de tecidos incluem ferramentas de preservação dos recursos genéticos, especialmente para espécies vulneráveis ou ameaçadas de extinção (SLAZAK *et al.*, 2015), o emprego dessas pode ser relevante para a espécie *B. zebrina*.

2.3 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecido vegetal é definida como um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições de inteira assepsia, com fatores nutricionais e ambientais controladas (THORPE, 2007). O fundamento básico da cultura de tecido é a totipotência das células, isto significa que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (HABERLAND, 1902; ISHIUCHI e TORRES-PADILLA, 2013).

Dentro da cultura de tecidos se destaca o cultivo *in vitro*, ferramenta importante para espécies que apresentam dificuldades de propagação por outros métodos vegetativos ou sexuais (FERREIRA *et al.*, 2015).

Os métodos tradicionais de propagação *in vitro* demandam a utilização de ambientes selados. Dessa forma os explantes cultivados crescem em taxas elevadas de umidade relativa, baixa intensidade de luz, alta disponibilidade de água no meio de cultura e desenvolvimento anatômico ineficaz (HAZARIKA, 2003).

A intensidade luminosa utilizada no cultivo *in vitro* pode alterar características, tais como espessura foliar, diferenciação do mesofilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (LEE *et al.*, 1988). A funcionalidade dos estômatos é pequena ou limitada (MARTINS *et al.*, 2014). Além de influenciar

intensamente a fotossíntese, a concentração de clorofila e a ultraestrutura de cloroplastos (LEE *et al.*, 1985). Essas modificações podem levar a incapacidade principalmente no controle de perda de água quando submetidas ao ambiente natural, levando a planta a uma transpiração excessiva (BRAINERD e FUCHIGAMI, 1981).

Os componentes minerais também apresentam importante papel na morfogênese *in vitro* das plantas. O meio desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), mais conhecido simplesmente como MS, é um dos mais utilizados para a propagação de várias espécies de plantas ornamentais (COELHO *et al.*, 2016; MUSZYŃSKA e HANUS-FAJERSKA, 2017; YU *et al.*, 2017), incluindo bromélias (MARTINS *et al.*, 2014, 2016; CORREDOR-PRADO *et al.*, 2015; SIMÃO *et al.*, 2016). A demanda dos componentes minerais do meio de cultivo pode variar entre as espécies ou na etapa de cultivo (MOREIRA *et al.*, 2012, MARTINS *et al.*, 2015). De acordo com a espécie ou a técnica utilizada os nutrientes do meio de cultura podem variar. Dessa forma, tem aumentado as modificações de meios existentes ou até mesmo novas formulações (GREENWAY *et al.*, 2012). A concentração mineral pode interferir no crescimento ou mesmo nos distúrbios fisiológicos (KURITA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2015).

Os meios nutritivos podem ser líquidos ou semissólidos, e concentrações ótimas de sais no meio líquido são diferentes das do meio semissólido, em virtude das restrições de velocidade de difusão e de gradientes de nutrientes (meio sólido) e oxigênio necessários para a respiração dos explantes em meio líquido (CALDAS *et al.*, 1998). Os meios de cultura sólidos ou semissólidos normalmente são solidificados com ágar. A consistência do meio de cultura depende da concentração e qualidade de ágar utilizada, do pH, do tipo de explante, da concentração de sais e da presença de outras substâncias como o carvão ativado, os quais interferem na gelificação (CALDAS *et al.*, 1998; MURASHIGE e SKOOG, 1974).

A propagação maciça de plantas tem sido tradicionalmente realizada em meio sólido (DEBNATH, 2007). No entanto, nos últimos anos, as culturas em meio líquido com o objetivo de propagação massiva de plantas têm aparecido como alternativa (AKIN-IDOWU *et al.*, 2009), mas podem induzir hiper-hidratação em plantas *in vitro* (CASANOVA *et al.*, 2008). Durante a multiplicação *in vitro* de *Nidularium innocentii*, *Nidularium procerum* (SILVA *et al.*, 2012) e *B. zebrina*

(MARTINS *et al.*, 2015b) nenhuma alteração morfológica aparente, como vitrificação, foi verificada nas plantas cultivadas em meio líquido.

Com o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, ou seja, não produzem totalmente sua fonte energética precisando consequentemente de uma fonte exógena de carboidratos (FARIA *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2016b).

2.4 Carboidratos

Os carboidratos têm função sinalizadora, podendo gerar alteração na expressão gênica similar aos efeitos atribuídos aos hormônios. A percepção ocorre através de sensores proteicos que desencadeiam uma cascata de eventos em nível celular, alterando a expressão gênica e as atividades enzimáticas, influenciando no crescimento das plantas (SMEEKENS, 2000).

Os carboidratos gerados no ciclo de Calvin são exportados, principalmente como triose-fosfatos, do cloroplasto para o citosol, onde é usado na glicólise (e subsequentemente na respiração ou biossíntese) ou convertido em sacarose para uso local ou exportação para os tecidos. A exportação ou importação líquida de sacarose depende do estado da fonte ou do dreno das células foliares (ROLLAND *et al.*, 2006).

O monômero centralizador dos carboidratos é a glicose. Da glicose os carboidratos podem ser estocados na forma de amido ou sacarose nas plantas (NELSON e COX, 2011). A sacarose é o principal carboidrato de transporte, enquanto o amido é o principal carboidrato de reserva. Uma parte significativa do gliceraldeído 3-fosfato produzido pelo ciclo de Calvin é transportada para o citoplasma, onde é rapidamente convertida em glicose 1-fosfato e frutose 6-fosfato (SMEEKENS, 2000). A glicose 1-fosfato é então convertida no nucleotídeo-açúcar UDP- glicose (uridina difosfato-glicose), que se liga à frutose 6-fosfato para formar a sacarose 6-fosfato, o precursor imediato da sacarose. A remoção do fosfato por hidrólise resulta na sacarose (NELSON e COX, 2011).

A maior parte do gliceraldeído 3-fosfato que permanece nos cloroplastos é convertida em amido, que é temporariamente estocado durante o período luminoso na forma de grãos no estroma. Através de uma série de reações, o gliceraldeído 3-fosfato é convertido em glicose 1-fosfato, que então é utilizada para produzir o nucleotídeo açúcar ADP- glicose, o precursor imediato do amido.

A glicose liga-se diretamente à cadeia de amido em crescimento pela ação da enzima sintase do amido (SMEEKENS, 2000; NELSON e COX, 2011). As sínteses de amido e de sacarose apresentam praticamente os mesmos intermediários (frutose-1,6-bisfosfato, frutose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, etc.). No entanto, estas vias biossintéticas possuem isoenzimas que são únicas para cloroplasto e citosol. Os fatores básicos que controlam se o carbono fixado fotossinteticamente é alocado como amido nos cloroplastos ou como sacarose no citosol é a concentração de fosfato inorgânico e triose fosfato (gliceraldeído- 3-fosfato) (ROLLAND *et al.*, 2006).

Em plantas superiores, duas classes de enzimas catalisam a clivagem da sacarose, a sacarose-sintase e invertase. As sintases de sacarose necessitam de UDP para clivar reversivelmente a sacarose em UDP- glicose e frutose. Em contraste, as invertases catalisam irreversivelmente a clivagem de sacarose em glicose e frutose (ROITSCH e GONZÁLEZ, 2004).

Dependendo do seu pH ótimo e localizações subcelulares, as invertases foram classificadas em três classes (RUAN, 2014). As invertases da parede celular são enzimas ligadas ionicamente à parede celular com um pH ácido ótimo de 3,5-5. Invertases vacuolar e invertases citoplasmáticas são enzimas solúveis com um pH ótimo ácido (pH 5,0-5,5) e neutro (pH 6,8-8,0), respectivamente (ROITSCH e GONZÁLEZ, 2004). As invertases de parede celular e as invertases vacuolar são submetidas a um controle pós-tradução por proteínas pequenas (15-23 kDa) que foram caracterizadas como inibidores específicos das p-fructosidases (HORTON *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2016).

Em tecidos drenos a sacarose pode ser importada para as células através de plasmodesma (transporte simplástico) ou por espaços entre as paredes celulares (transporte apoplástico). A sacarose intracelular é clivada pelas invertases citoplasmáticas, gerando glicose e frutose, ou por sacarose sintase produzindo frutose e UDP- glicose. A sacarose também pode ser importada e armazenada no vacúolo, e sofrer clivagem pelas invertases vacuolar uma importante fonte intracelular de hexoses em tecidos em expansão (ROLLAND *et al.*, 2006).

No apoplasto a sacarose extracelular é hidrolisada por invertases de parede celular, uma das principais forças motrizes na manutenção de gradientes e, portanto, na força dreno. Estas enzimas geram níveis elevados de glicose

extracelular e frutose que são transportados por transportadores de hexose, co-expressa e coordenadamente regulada com invertase de parede celular (ROITSCH e GONZALEZ, 2004). É evidente que o transporte de sacarose e a hidrólise desempenham papéis reguladores importantes na alocação e geração de sinal de carboidrato. Uma extensa regulação de feedback das invertases e sacarose sintase por sinalização de carboidrato gera uma autorregulação (KOCH, 2004). Estresse e sinais hormonais também podem induzir Invertase de parede celular e dreno no tecido foliar (ROITSCH e GONZALEZ, 2004).

A sacarose, glicose e frutose são carboidratos que desempenham funções essenciais no metabolismo das plantas. Esses carboidratos fornecem energia e esqueleto de carbonos necessários à síntese de polissacarídeos, aminoácidos e proteínas (SMEEKENS, 2000).

O metabolismo do carboidrato é um processo muito dinâmico, e os fluxos metabólicos e concentrações de carboidrato alteram dramaticamente tanto durante o desenvolvimento e em resposta a sinais ambientais tais como alterações diurnas e estresse biótico e abiótico (ROITSCH, 1999; BORISJUK *et al.*, 2003; BLASING *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2005; WEBER *et al.*, 2005).

No cultivo *in vitro* as plantas ficam em câmaras com baixa densidade de fluxo de fótons (DFF) e isso pode limitar o desenvolvimento fotossintético e mecanismos fotoprotetores eficientes (SAEZ *et al.*, 2012). Mecanismos como dissipação de calor e processo fotoquímico que drenam o excesso de elétrons acumulados no intersistema permitem o gerenciamento do excesso de energia luminosa absorvida (HORTON e RUBAN, 2005). Através destes processos, a energia luminosa é usada para produzir ATP e NADPH na reação (fase fotoquímica) e, posteriormente, dependente indiretamente da luz, o carbono é fixado em carboidratos (fase bioquímica) (BERTAMINIA *et al.*, 2006).

Sob baixo DFF, o ATP produzido é insuficiente para permitir a fixação de carbono e a biossíntese de carboidratos, levando a um crescimento reduzido das plantas. Isto torna necessário incluir na cultura uma fonte externa de carbono orgânico que seria crucial para o crescimento *in vitro* (MOHAMED e ALSADON, 2010). Além da suplementação de carboidrato no meio *in vitro* ajudar na conservação da água e na manutenção do potencial osmótico de células (HAZARIKA, 2003).

Alguns estudos mostraram que a sacarose funciona como uma molécula de sinalização envolvida na regulação de vários processos fisiológicos em plantas como o crescimento radicular, o desenvolvimento, e alongamento do hipocótilo (LILLEY *et al.*, 2012; RUAN, 2014). A sacarose também está envolvida em respostas de estresse abiótico e biótico, como em relação à seca, salinidade, ferimento e infecção por patógenos (COUEE *et al.*, 2006; WIND *et al.*, 2010).

A sobrevivência das plantas e taxas de crescimento nos períodos de aclimação está intimamente relacionada à tratamentos com sacarose (MOHAMED e ALSADON, 2010). Os açúcares em geral são conhecidos por reprimir a expressão de genes fotossintéticos e acumulação de clorofila (ROLLAND *et al.*, 2006; GASPAR *et al.*, 2002), e sacarose pode ter efeitos de feedback negativo sobre a fotossíntese, reduzindo a quantidade e a atividade da Rubisco (BADR *et al.*, 2011; 2015). Este efeito negativo baseia-se no conceito de equilíbrio entre processos de consumo e produção de açúcar. Assim, a presença de açúcar no meio diminui a necessidade de produção de açúcar e, portanto, deve resultar em baixas taxas fotossintéticas (KOCH, 1996).

Saez *et al.*, (2016) verificaram que a utilização de sacarose como fonte externa de carboidratos, durante a fase de proliferação de microbrotos de *Castanea sativa*, teve um efeito positivo sobre a fotossíntese, conteúdo clorofila e crescimento. Além de modular respostas morfogênicas (MARTINS *et al.*, 2015) e influenciar de forma positiva o enraizamento *in vitro* (FERREIRA *et al.*, 2011). Borkowska e Szczerba (1991) analisaram que os carboidratos sacarose, glicose, frutose e o álcool açúcar sorbitol beneficiaram o crescimento de *Prunus cerasus* L. quando as suas concentrações estavam entre 20 e 30 g L⁻¹; contudo, na presença de frutose, a proliferação foi a mais baixa; entretanto, a frutose favoreceu a maior frequência de brotações longas.

Besson *et al.*, (2010) analisaram diferentes fontes e concentrações de carboidratos no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. Foi percebido que o cultivo com 30 g L⁻¹ de sacarose ou glicose resultou em maior comprimento da parte aérea e aumento de massa fresca, enquanto a multiplicação de brotos foi beneficiada pela presença de 45 g L⁻¹ dos mesmos carboidratos. O efeito da glicose no enraizamento gerou os maiores valores nas menores concentrações testadas, ou seja, 15 e 30 g L⁻¹, não havendo diferenças entre essas concentrações.

A suplementação positiva de carboidrato propicia a formação de estoque de carboidratos na propagação *in vitro* (FERREIRA *et al.*, 2011) e esse aumento no estoque de carboidratos melhora o desempenho da fase de aclimatização (FUENTES *et al.*, 2005; BADR *et al.*, 2015). Além de modular respostas morfogênicas (MARTINS *et al.*, 2015) e influenciar de forma positiva o enraizamento *in vitro* (FERREIRA *et al.*, 2011). Estudos recentes com *B. zebrina* propagada *in vitro* verificaram como a sacarose modula o enraizamento, crescimento da parte aérea, anatomia foliar e a fisiologia dessa espécie (MARTINS *et al.*, 2015a, 2015b, 2016a).

2.5 Fluorescência da clorofila a

A cadeia de transporte de elétrons é composta por complexos de proteínas incorporados na membrana do tilacóide. Os principais componentes são o fotossistema II (FSII) e o fotossistema I (FSI), conectados em série via complexo citocromo b6f e plastocianina (PC). A interconexão entre os complexos envolvidos no fluxo de elétrons é mediada por plastoquinonas, moléculas portadoras móveis, que estão localizadas na região hidrofóbica da membrana do tilacóide (PRIBIL *et al.*, 2014).

Moléculas de clorofila do sistema antena dos fotossistemas, ao capturar energia luminosa, passam do estado fundamental para um estado excitado. Esta energia de excitação pode ser utilizada por meio de um efeito fotoquímico. No entanto, nem toda a energia absorvida é dirigida para este fim, parte pode ser dissipada como calor ou reemitida como fluorescência (TAIZ e ZEIGER, 2009). Do fotossistema II (FSII) e do seu sistema coletor de luz (LHCII), que é emitida a maior parte da fluorescência da clorofila a, dessa forma os estudos têm sido relacionados com respostas de fluorescência, quando um tecido fotossintetizante é rapidamente iluminado, após uma adaptação ao escuro (PAUNOV *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2018). Os centros de reação no escuro são denominados “abertos”, pois a quinona A (Q_A) está completamente oxidada, e assim é capaz de realizar a redução fotoquímica da Q_A (BAKER, 2008).

Estudos recentes sugerem que a fluorescência da clorofila podem prover pontos de referência únicos para aprimorar os modelos globais de produtividade agrícola, melhorando a confiabilidade das projeções de rendimento e cenários de mudança climática (GUANTER *et al.*, 2014; MALASPINA *et al.*, 2014). De um

modo mais geral, a fluorescência da clorofila está a emergir uma ferramenta poderosa na agricultura, meio ambiente e estudos (GOTTARDINI *et al.*, 2014).

A análise da fluorescência da clorofila *a* é capaz de detectar com segurança e confiabilidade efeitos de estresse e injúrias nos processos fotossintéticos causados por fatores bióticos ou abióticos. As mudanças na cinética de emissão de fluorescência da clorofila *a* a partir de organismos fotossintéticos, são resultados de frequentes modificações na atividade fotossintética, principalmente com relação a eficiência quântica do transporte de elétrons através do FSII em folhas (YUSUF *et al.*, 2010, BAKER e ROSENQVIST, 2004).

O valor medido da fluorescência pode fornecer informações da eficiência potencial e atual da fotossíntese e da integridade do aparelho fotossintético. Isto é porque a energia luminosa absorvida tem três destinos gerais: pode ser usada para fotossíntese, ela pode ser dissipada como calor em um processo fotoprotetor ou pode ser reemitido como fluorescência (MAXWELL e JOHNSON, 2000; MURCHIE e LAWSON, 2013). Geralmente, estes três processos estão em concorrência, medindo a quantidade e o rendimento da fluorescência reemitida permite-nos obter informações sobre a condução energética da fotossíntese e fotoproteção. Dessa forma, existem vários parâmetros de fluorescência para a interpretação das variáveis do processo fotossintético (MAXWELL e JOHNSON, 2000). Alguns parâmetros são gerados diretamente enquanto outros são decorrentes das relações entre estes. Os parâmetros básicos da fluorescência da clorofila *a* são: F_0 , F_V , F_M , e F_V/F_M .

A fluorescência inicial (F_0), corresponde o estado da clorofila *a* do complexo antena. Segundo Goltsev *et al.*, (2016) o F_0 é uma medida da distribuição inicial da energia, antes do éxciton migrar para o centro de reação (P680) do FSII. A fluorescência máxima (F_M) é definida como a intensidade de fluorescência em que todos os centros de reação do FSII estão fechados (VAN KOOTEN e SNEL, 1990). Todas as moléculas de plastoquinona do FSII se reduzem, todos os centros de reação FSII são temporariamente fechados e não pode passar elétrons adicionais (GOLTSEV *et al.*, 2016).

A diferença entre F_M e F_0 é chamada de fluorescência variável (F_V). O F_V mostra sensível à taxa de transporte de elétrons através dos centros de reação e às mudanças na estrutura da membrana do tilacóide (GEORGIEVA e

YORDANOV, 1993). O valor baixo deste parâmetro indica a redução da atividade fotossintética e dissipação da energia de excitação na forma de calor. Fatores ambientais (baixas e altas temperaturas, congelamento, etc.) e fatores de estresse tendem a diminuir o F_v (REIGOSA *et al.*, 2001).

A razão entre as fluorescências variável e a máxima (F_v/F_M ou ϕP_0) expressa a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (GOLTESEV *et al.*, 2016). O ϕP_0 tem sido amplamente utilizado para comparar tecidos saudáveis e danificados devido a fatores bióticos (ROUSSEAU *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2016). A versatilidade das medições das clorofilas significa que elas podem ser aplicadas a nível de uma única planta até pastagens, terras cultiváveis e até mesmo ecossistemas marinhos (KALAJI *et al.*, 2016).

O emprego da fluorescência da clorofila *a* pode ser usada com a finalidade de monitorar os efeitos das condições de cultivo *in vitro* ou durante a aclimatização (CASSANA *et al.*, 2010; DOBRÁNSZKI e DRIENYOVSKI, 2014; MARTINS *et al.*, 2015c; MATYSIAK e GABRYSZEWSKA, 2016). Medidas da fluorescência da clorofila é um método não destrutivo, sensível, rápido e de alta aplicabilidade em condições de campo e de laboratório, assim, uma ótima ferramenta para estudo de fisiologia de plantas.

2.6 Anatomia vegetal

A família Bromeliaceae apresenta estruturas anatômicas características, tais como: tricomas, presença de ceras, epiderme uniestratificada revestida por cutícula, com diâmetro maior perpendicular ao eixo da folha e presença de hipoderme (PY, 1969; MANTOVANI *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2014).

Os estômatos encontram-se dispostos longitudinalmente em sulcos pequenos e paralelos na face abaxial da epiderme de bromélias *in vivo*. Logo abaixo da face adaxial da epiderme, no mesofilo, se encontra o tecido aquífero que pode ser clorofilado ou não, onde estão os feixes vasculares, cordões de fibras isolados e canais de aeração (PY, 1969; PY *et al.*, 1984). Contudo, as condições *in vitro* podem alterar essas características (LEE *et al.*, 1988; EBURNEO *et al.*, 2017). Quando cultivadas *in vitro* as folhas são delgadas, fotossinteticamente inativas, camada de cera epicuticular fina (AFREEN, 2004),

na maioria das vezes apresentam estômatos disfuncionais (DIAS *et al.*, 2014a) e células epidérmicas com parede celular não lignificada (BELLINTANI *et al.*, 2007).

Estudos sobre alterações anatômicas de bromélias *in vitro* já foram realizados para avaliar aspectos morfológicos, anatômicos e ultraestruturais de *Aechmea bromeliifolia* cultivada *in vitro* e *ex vitro* (SILVIA, 2016); para analisar alterações anatômicas de *Billbergia zebrina* em face da exposição ao metal pesado cobre (MARTINS *et al.*, 2016a) e para avaliação da funcionalidade estomática de *Aechmea blanchetiana* sob diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-furfurilaminopurina (cinetina) (ROSA *et al.*, 2018).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas fisiológicas e anatômicas de *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) em função de fontes e concentrações de carboidratos durante o cultivo *in vitro*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as repostas fisiológicas dos diferentes carboidratos sobre a cinética da fluorescência da clorofila *a* nas plantas de *Billbergia zebrina*.
- Avaliar as modificações anatômicas influenciadas pelos tipos e concentrações de carboidratos;
- Avaliar alterações no ganho de matéria fresca nas plantas submetidas aos tratamentos com as diferentes fontes e concentrações de carboidratos;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material vegetal, condições de cultivo, estabelecimento e multiplicação *in vitro*

O experimento foi desenvolvido em sala de crescimento, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, na Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus/ES. Plantas de *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley previamente estabelecidas *in vitro* (espécime voucher 27.329 – ESAL herbário) foram utilizadas como fonte de explantes. As plantas foram multiplicadas em meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962) líquido estacionário suplementado com 13 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 30 g L⁻¹ de sacarose. Após 45 dias de cultivo,

os explantes com os brotos laterais induzidos foram subcultivados durante 45 dias em frascos de vidro de 268 mL com 50 mL de meio de cultura MS estacionário líquido, sem regulador de crescimento de plantas e suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose. Os meios de cultivo tiveram o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos. Após a inoculação dos explantes em câmara de fluxo laminar, o material foi mantido em sala de crescimento a $26\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas (8:00 - 00:00 h), sob lâmpadas fluorescentes (Empalux® FT8 HO, 36W/6400K) emitindo $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa.

5.2 *Condição de cultivo in vitro*

Os brotos laterais obtidos (~2 cm de comprimento) após a etapa de subcultivo foram individualizados com um bisturi. Os brotos foram transferidos para frascos de vidro de 268 mL contendo 50 mL de meio MS solidificado com $6,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Vetec®), suplementado com três diferentes tipos de carboidratos (frutose, glicose e sacarose) em quatro concentrações (0, 15, 30 e 45 g L^{-1}). Em cada frasco foram colocados cinco brotos, foram utilizados sete frascos por tratamento. O pH dos meios foi ajustado para 5,9, antes da autoclavagem a 120°C durante 20 min. Em seguida, os explantes foram inoculados em câmara de fluxo laminar, o material foi mantido em sala de crescimento, por 55 dias, a $26\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas (8:00 - 00:00 h), sob lâmpadas fluorescentes (Empalux® FT8 HO, 36W/6400K) emitindo $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa.

5.3 *Fluorescência da clorofila a*

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada aos 55 dias de cultivo em 15 plantas de cada tratamento. A coleta dos dados foi realizada com o auxílio de um fluorômetro portátil Handy PEA (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, Reino Unido) entre 7:30 - 8:30 da manhã. Clipes foliares foram utilizados por 30 minutos na terceira folha (a partir do centro da roseta) de cada planta para adaptação ao escuro, para dessa forma oxidar por completo os sistemas fotossintéticos e assim as medidas serem realizadas. A intensidade da luz saturante do aparelho é de $3000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. O teste JIP foi avaliado a partir dos transientes OJIP, com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (STRASSER *et al.*, 2004) levando em consideração os parâmetros citados na tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos parâmetros do teste JIP com base em CHEN *et al.*, (2016) e GOLTSTEV *et al.*, (2016).

Parâmetros da fluorescência	Descrição
<i>Dados extraídos do transiente de fluorescência OJIP</i>	
$F_0 = F_{20\mu s}$	Fluorescência inicial (quando todos os centros de reações do FSII estão abertos)
$F_K = F_{0,3ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto K aos 300 μs do transiente OJIP
$F_J = F_{2ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto J aos 2 ms do transiente OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto I aos 30 ms do transiente OJIP
$F_P = F_{300ms}$	Fluorescência máxima (quando todos os centros de reações do FSII estão fechados)
<i>Parâmetros técnicos</i>	
$F_0 = F_{0,02ms}$	Fluorescência inicial
F_M	Fluorescência máxima
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável
$M_0 = d_v/dt_0 = [4 (F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)]$	Origem da inclinação da curva de fluorescência [= taxa relativa de redução de Q_A].
$V_J = (F_{2ms} - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável normalizada no ponto J (2 ms)
$V_I = (F_{30ms} - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável normalizada no ponto I (30 ms)
<i>Parâmetros de rendimento quântico</i>	
$\phi P_0 = TR_0/ABS = (F_M - F_0)/F_M = 1 - (F_0/F_M)$	Rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária
$\phi E_0 = \phi P_0 \psi E_0 = (TR_0/ABS)(ET_0/TR_0) = ET_0/ABS = (1 - F_0/F_M)(1 - V_J)$	Rendimento quântico do transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores de elétrons do intersistema
$\phi D_0 = DI_0/ABS = 1 - \phi P_0 = F_0/F_M$	Rendimento quântico da energia dissipada
<i>Parâmetros fenomenológicos de fluxo de energia</i>	
ABS / CS_M	Energia absorvida por seção transversal (CS) na fluorescência máxima ($t = t_{FM}$), igual aproximadamente a F_M ;
TR_0/CS_M	Fluxo de energia capturada por centros de reação do fotossistema II (FSII) por seção transversal em $t = t_{FM}$;
ET_0/CS_M	Fluxo de elétrons através do FSII por seção transversal (CS) em $t = t_{FM}$
DI_0/CS_M	Dissipação térmica de energia do FSII por seção transversal (CS) em $t = t_{FM}$;
(CS/ABS)	Número de centros de reação ativos

5.4 *Análise anatômica da folha*

A densidade estomática e caracterização dos vasos do xilema das plantas de *B. zebrina* foram realizadas em quatro plantas de cada tratamento. As amostras foram recolhidas aleatoriamente e fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético e 50% de etanol, 0,5: / 0,5: / 9, v / v) durante 72 h, seguido de armazenamento em etanol a 50% (JOHANSEN, 1940). Seções transversais foram realizadas com auxílio de uma lâmina de aço, na região mediana da primeira folha completamente expandida a partir da roseta. A densidade estomática foi obtida a partir da face abaxial da segunda folha completamente expandida. Com 2,5% de hipoclorito de sódio (v / v) as seções foram clarificadas e coradas com solução de safra-blau. Para a caracterização paradérmica, as folhas foram descoradas com 15% hipoclorito de sódio (v / v) e coradas com safranina (1%). As lâminas foram montadas com 50% de glicerina. Para a quantificação da densidade estomática, fotomicrografias foram feitas em três regiões da folha (base, mediana e ápice). As seções foram visualizadas e as imagens foram capturadas usando um microscópio de luz LEICA DM 1000 combinado com a câmera ICC50 HD (LEICA®, Wetzlar, Alemanha). As fotomicrografias das seções paradérmicas foram feitas em quatro folhas diferentes e em quatro campos distintos por região foliar. Para avaliação do diâmetro e número dos vasos do xilema, fotografias também foram realizadas em quatro folhas e em duas seções transversais distintas por repetição. O software UTHSCSA-Imagetool® foi utilizado para medir as características anatômicas das fotomicrografias.

5.5 *Análise de crescimento*

Para a avaliação do crescimento, vinte plantas de cada tratamento foram coletadas aleatoriamente, divididas em quatro parcelas e pesadas em balança de precisão. Posteriormente, a média em gramas (g) de cada parcela foi dividida por cinco para obtenção do valor do peso médio por planta.

5.6 *Análise estatística*

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, contendo quatro concentrações (0, 15, 30 e 45 g L⁻¹) e três carboidratos (frutose, glicose e sacarose). Os dados resultantes foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando o teste de

agrupamento, Scott-Knott com um nível de probabilidade de 5%. O programa utilizado para realização das análises foi o Sisvar® (FERREIRA, 2011).

6. RESULTADOS

6.1 Fluorescência transiente da clorofila *a*

A análise da fluorescência transiente da clorofila *a* revelou diferenças fisiológicas em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas sob diferentes fontes e concentrações de carboidratos. As figuras 1A-C mostram curvas típicas O-J-I-P para as plantas cultivadas nos três carboidratos. Foi possível visualizar também para plantas que estavam em meio de cultivo não suplementadas com carboidrato (controle) uma redução na fluorescência máxima (F_M) e aumento da fluorescência inicial (F_0). Essa diferença entre F_M e F_0 provocou uma redução na fluorescência variável (F_V). Plantas cultivadas com sacarose obtiveram valores de F_V superiores em relação aos demais tipos de carboidratos. O tipo e as concentrações de carboidrato variaram significativamente para o F_M e para o F_V , enquanto que para F_0 apenas as concentrações influenciaram (Figs. 1A, 1B e 1C).

Nas curvas da fluorescência relativa variável, observou-se um aumento expressivo do V_J (~0,65) e redução no ponto I ($V_I = \sim 0,831$) nas plantas cultivadas sem suplementação de carboidratos no meio de cultivo. Por outro lado, quando as plantas foram cultivadas em meio com carboidratos, os valores de V_J (~0,51) e V_I (~0,87) foram menores e maiores, respectivamente, em relação às plantas do controle (Figs. 1D, 1E e 1F).

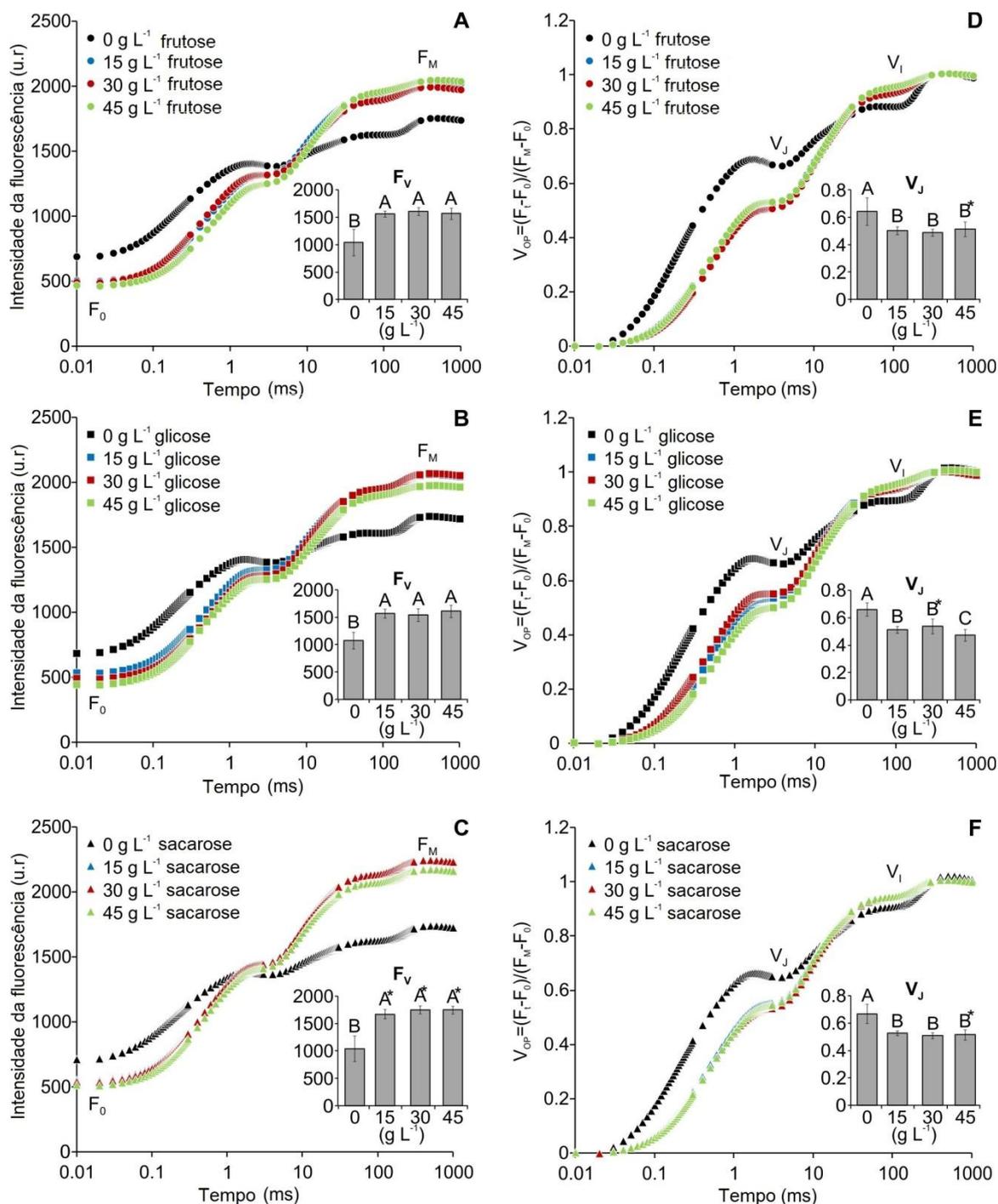


Figura 1: Curvas de indução rápida da fluorescência transiente da clorofila *a* e fluorescência variável (F_V) (A, B e C); Fluorescência relativa variável entre F_0 e F_M (V_{OP}) e fluorescência relativa variável no ponto J em função de carboidratos ($g L^{-1}$) no cultivo *in vitro* (D, E e F). Nos gráficos de coluna, médias seguidas ($\pm DP$) pela mesma letra para F_V e V_J não são significativamente diferentes entre as concentrações de acordo com o teste Scott-Knott, a 5%. Para cada carboidrato, médias seguidas ($\pm DP$) por asterisco são diferentes significativamente de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.

A fluorescência transiente da curva OJIP entre os pontos O (20 μs) e K (300 μs) e entre os pontos O (20 μs) e J (2 ms) foram normalizadas e apresentadas como diferenças cinéticas [$\Delta V_{OK} = V_{OK \text{ tratamento}} - V_{OK \text{ controle}}$] e [$\Delta V_{OJ} = V_{OJ \text{ tratamento}} -$

$V_{OJ\text{ controle}}$], respectivamente. Desvios negativos foram observados para as bandas L e K em todos os tratamentos quando comparadas às plantas cultivadas sem carboidratos (Fig. 2).

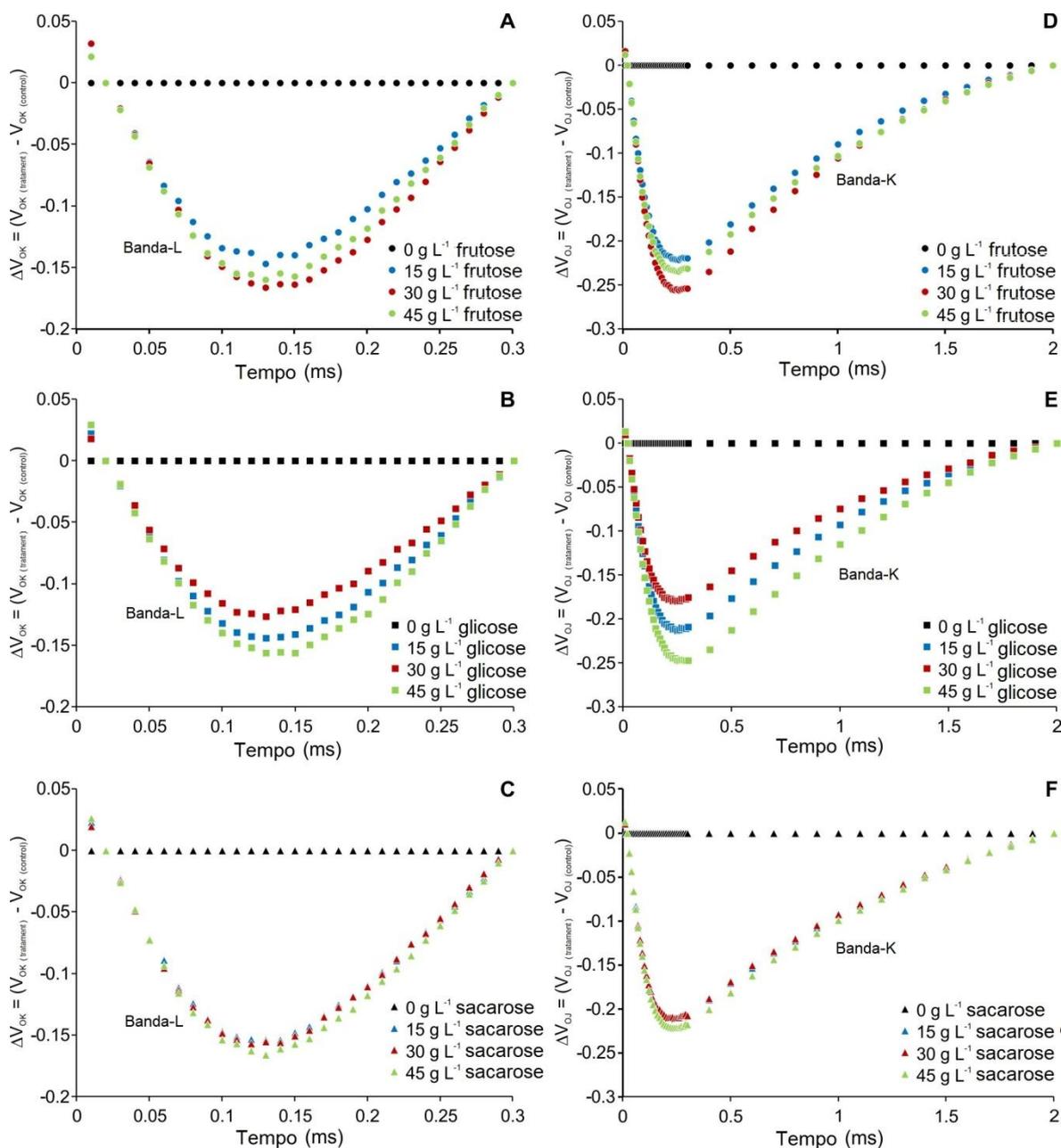


Figura 2: Diferenças cinéticas da fluorescência variável evidenciando o aparecimento da banda L [$\Delta V_{OK} = V_{OK\text{ tratamento}} - V_{OK\text{ controle}}$] (A, B e C); banda K [$\Delta V_{OJ} = V_{OJ\text{ tratamento}} - V_{OJ\text{ controle}}$] (D, E e F). O tempo está representado em escala logarítmica (ms).

Os parâmetros fenomenológicos do teste JIP por seção transversal (CS) variaram significativamente em função da concentração e das fontes de carboidratos, exceto para dissipação (DI_0/CS_M), os quais apenas a concentração teve influência em seu resultado. Ao restringir a fonte de carboidrato, a absorção (ABS/CS_M), a captura (TR_0/CS_M), o transporte de elétrons por seção transversal

(ET_0/CS_M) e o número de centros de reação ativos (CS/ABS) foram reduzidos e diferentes estatisticamente das demais. Inversamente, a dissipação (DI_0/CS_M) apresentou valores mais altos para plantas sem suplementação com carboidrato. As plantas cultivadas com sacarose na concentração de 30 g L^{-1} apresentaram um maior valor para os parâmetros acima quando comparada com frutose e glicose (Fig. 3).

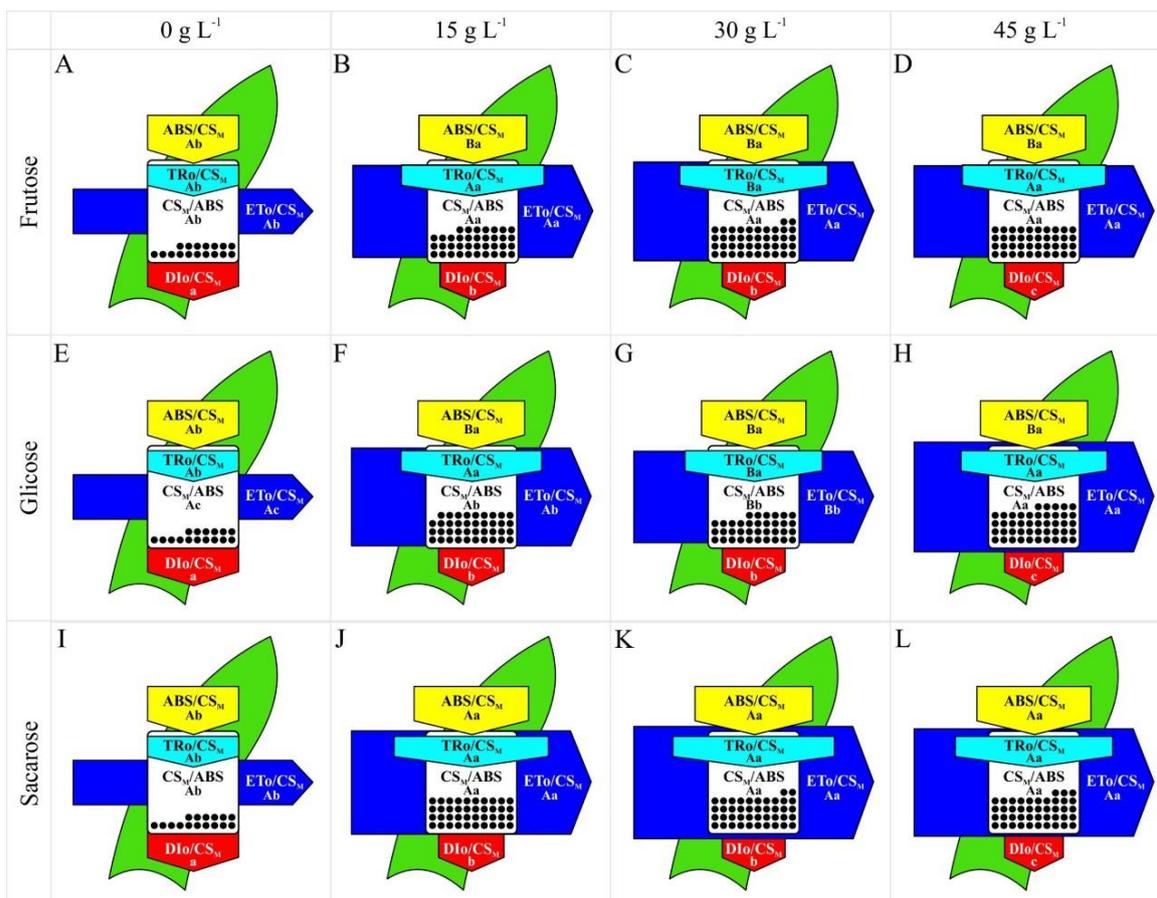


Figura 3: Modelos de fluxos fenomenológicos de energia por seção transversal em folhas de *B. zebrina* aos 55 dias em função de fontes e concentrações de carboidratos. ABS / CS_M - fluxo de absorção por seção transversal, TR₀ / CS_M - fluxo de energia capturada por seção transversal, ET₀ / CS_M - fluxo de transporte de elétrons por CS, DI₀ / CS_M - fluxo de energia dissipada por CS_M. CS_M / ABS - os centros de reação ativos (RCs) são indicados por círculos pretos. Em cada parâmetro, médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para fonte de carboidrato e caixa baixa para concentração de carboidrato, não são significativamente diferentes de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.

Os parâmetros biofísicos do teste JIP são mostrados na tabela (Tab. 2). Os valores do rendimento quântico da reação fotoquímica primária (ϕP_0), e de transporte de elétrons (ϕE_0) para plantas suplementadas com carboidrato exógeno foram mais alto quando comparados com plantas que não receberam carboidrato. Por outro lado, a eficiência quântica de dissipação de energia (ϕD_0) e

a taxa de fechamento dos centros de reação (M_0) foram reduzidos independente do carboidrato utilizado no meio de cultura.

Tabela 2: Taxa líquida de fechamento dos centros de reação do FSII (M_0) e rendimento quântico com base na cinética de emissão de fluorescência em função de concentrações de carboidratos.

Carboidrato (g L ⁻¹)	M_0	ϕP_0	ϕE_0	ϕD_0
0	1,60 ± 0,38 ^a	0,55 ± 0,09 ^b	0,19 ± 0,07 ^b	0,45 ± 0,09 ^a
15	0,82 ± 0,09 ^b	0,73 ± 0,02 ^a	0,35 ± 0,03 ^a	0,27 ± 0,02 ^b
30	0,81 ± 0,17 ^b	0,74 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,04 ^a	0,26 ± 0,02 ^b
45	0,76 ± 0,19 ^b	0,76 ± 0,02 ^a	0,38 ± 0,05 ^a	0,24 ± 0,02 ^b

Em cada parâmetro do teste JIP, médias seguidas (\pm DP) pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.

6.2 Análise anatômica da folha

As folhas de *B. zebrina* crescidas nas condições *in vitro* apresentaram aumento na densidade estomática a partir da base até o ápice foliar, independentemente do tratamento empregado (Fig. 4). Quando analisados os fatores, apenas as concentrações influenciaram a densidade dos estômatos nas três regiões foliares analisadas. A maior densidade estomática foi verificada nas plantas cultivadas com 15 e 30 g L⁻¹ de carboidrato exógeno suplementado no meio de cultura (Fig. 4, Tab. 3).

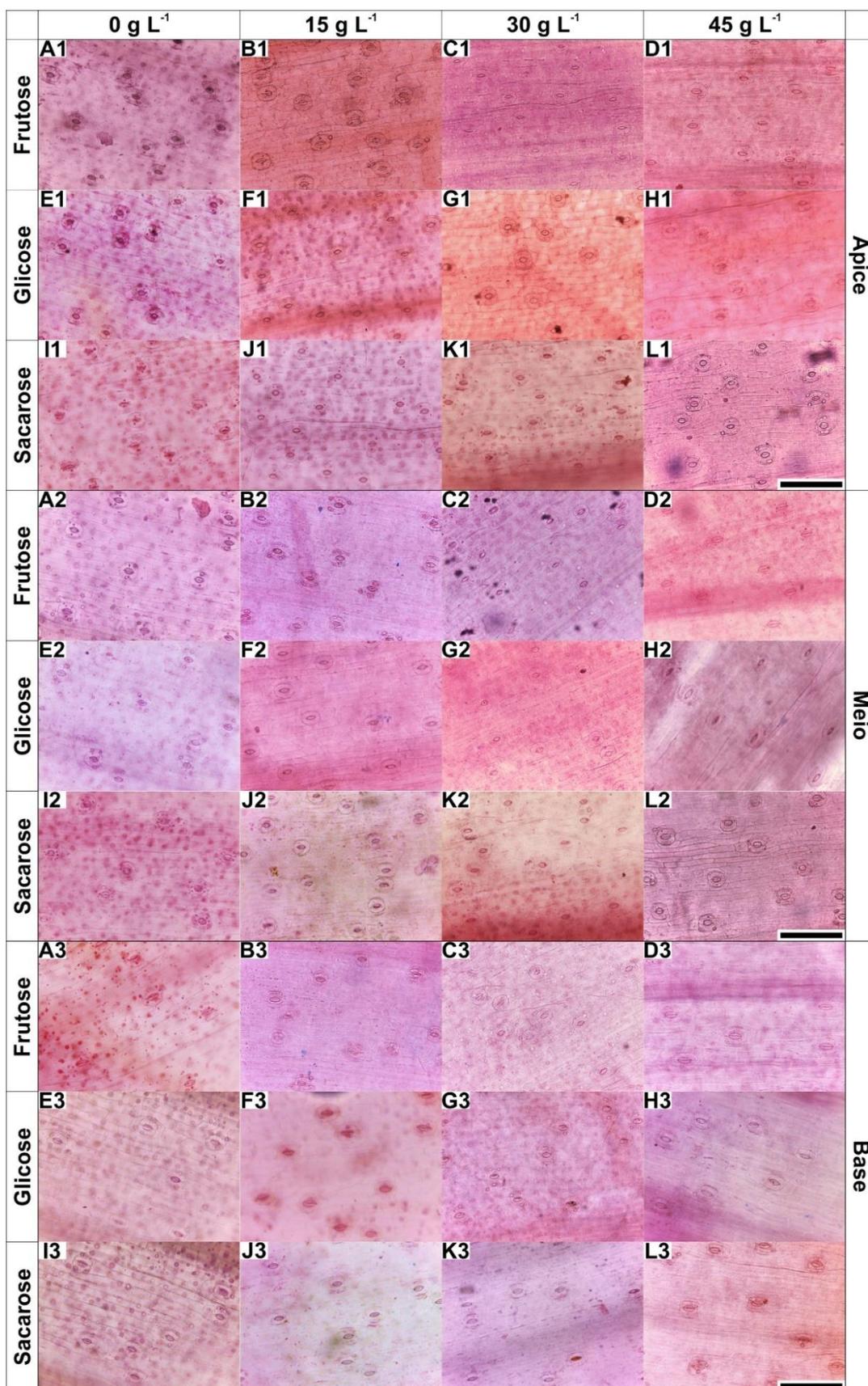


Figura 4: Seções paradérmicas das diferentes regiões foliares de *B. zebrina* aos 55 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações (0, 15, 30 ou 45 g L⁻¹) de frutose, glicose ou sacarose. Barra = 100 µm.

Tabela 3: Densidade estomática (0.1 mm^2) em folhas de *B. zebrina* em função da concentração de carboidrato (g L^{-1}) suplementado no meio de cultura.

Carboidrato (g L^{-1})	Base	Mediana	Ápice
0	$8,28 \pm 2,51^b$	$12,71 \pm 2,41^b$	$15,75 \pm 2,43^b$
15	$12,84 \pm 2,78^a$	$15,59 \pm 2,64^a$	$18,78 \pm 4,06^a$
30	$12,17 \pm 2,24^a$	$16,45 \pm 2,55^a$	$18,55 \pm 1,54^a$
45	$9,13 \pm 2,83^b$	$12,09 \pm 2,29^b$	$15,85 \pm 1,66^b$

Para cada região foliar, os valores médios (\pm DP) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O diâmetro e a densidade de vasos do xilema foram influenciados tanto pela concentração quanto pelas fontes de carboidrato. Plantas cultivadas com glicose apresentaram vasos do xilema com maior diâmetro, principalmente na concentração de 15 e 30 g L^{-1} (Figs. 5, 6A). No entanto, o maior número de vasos foi observado em plantas que receberam frutose na concentração de 15 e 30 g L^{-1} (Figs. 5, 6B).

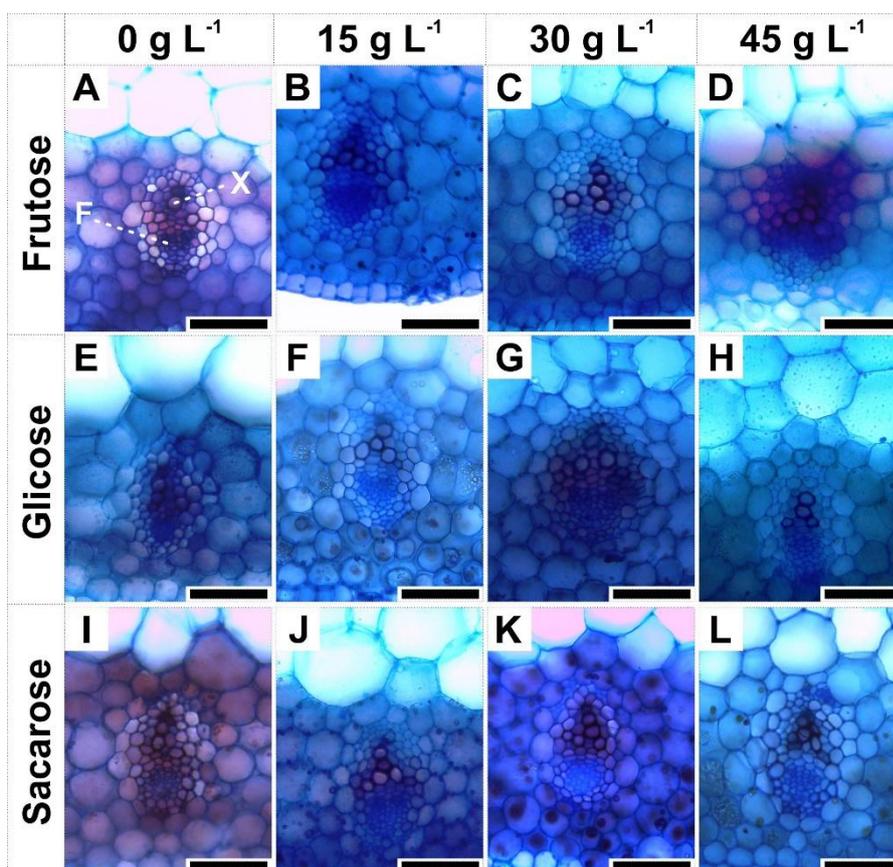


Figura 5: Seções transversais de folhas de *B. zebrina* aos 55 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações (0, 15, 30 ou 45 g L^{-1}) de frutose, glicose ou sacarose. Barra = 50 μm .

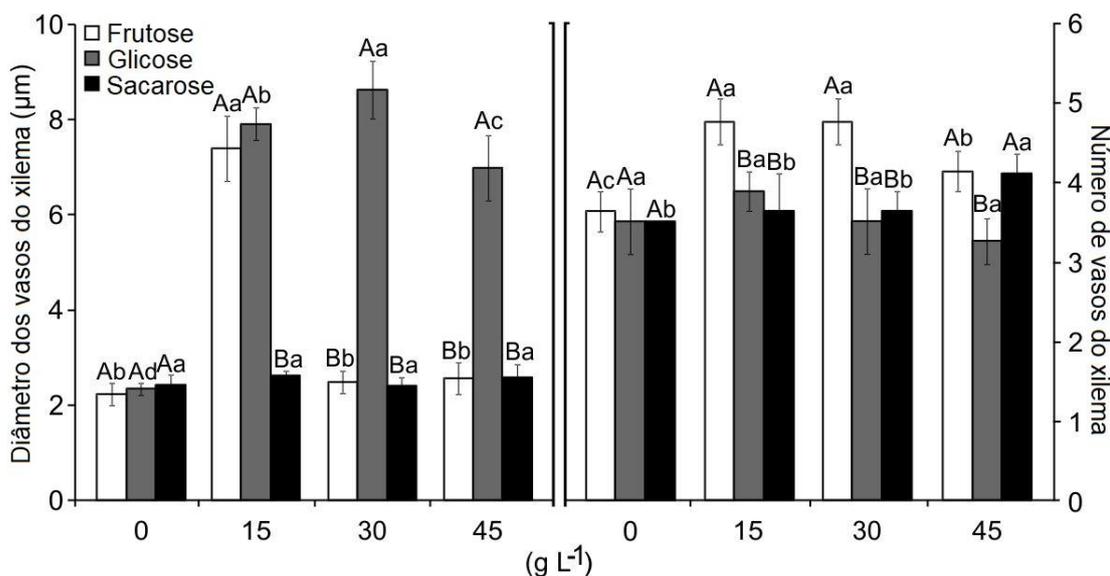


Figura 6: Diâmetro dos vasos do xilema (A) e densidade de vasos xilemáticos (B) em função de concentrações e fontes de carboidratos. Médias seguidas (\pm DP) pela mesma letra, maiúscula em cada nível de concentração e minúscula em função do tipo de carboidrato, não diferem entre si de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.

6.3 Análise de crescimento

Aos 55 dias de cultivo, o enraizamento foi verificado em todos os tratamentos; contudo, as plantas cultivadas com glicose apresentaram visualmente um maior número de raízes, quando comparadas as plantas cultivadas na mesma concentração de sacarose e frutose (dados não mostrados). Isto teve influência direta na massa fresca.

A massa fresca das plantas apresentou interação significativa de ambos fatores de variação. O incremento da massa fresca foi verificado em função do aumento da concentração de carboidratos adicionados no meio, seguida de decréscimo quando cultivadas com 45 g L⁻¹ (glicose e sacarose). Apenas no tratamento com 45 g L⁻¹ de frutose houve aumento da massa, contudo isso foi devido à formação de multibrotações formadas na base dos explantes (Fig. 7).

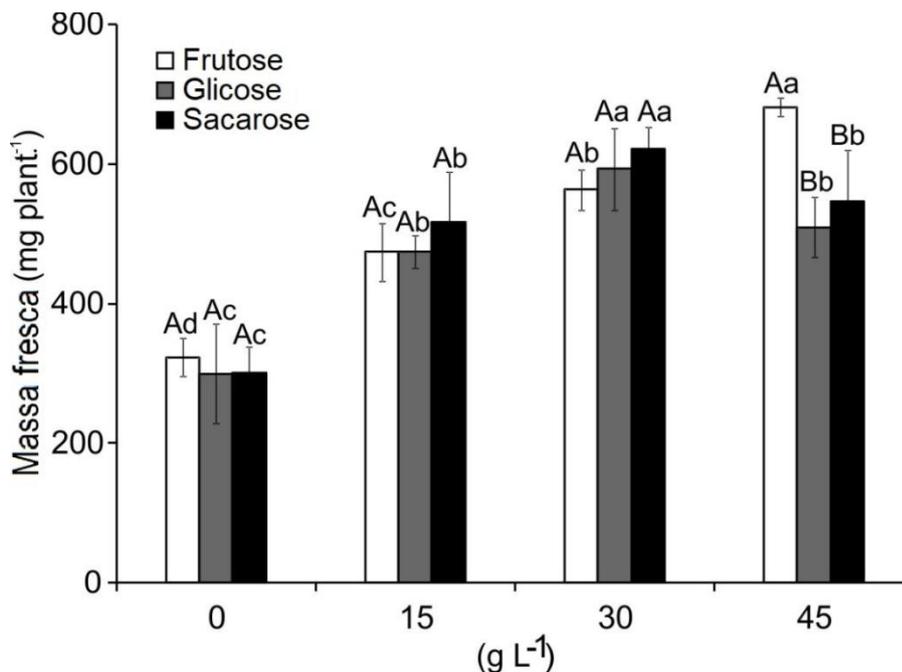


Figura 7: Massa fresca (mg / planta) de plantas de *B. zebrina* cultivadas *in vitro* em função de concentrações e fontes de carboidratos. Médias seguidas (\pm DP) pela mesma letra, maiúscula em cada nível de concentração e minúscula em função do tipo de carboidrato, não diferem entre si de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5%.

7. DISCUSSÃO

Todas as plantas de *B. zebrina* apresentaram curvas OJIP com aumento polifásico característico, o que indica que essas estavam fotossinteticamente ativas (YUSUF *et al.*, 2010). O aumento nos valores de F_0 nas plantas cultivadas sem suplementação de carboidrato exógeno está relacionado à uma inibição parcial do centro de reação do FSII, com redução do fluxo de elétrons da Quinona A (Q_A) para Quinona B (Q_B) (STRASSER e STRASSER, 1995; GOLTSEV *et al.*, 2016). Essa redução da transferência de elétrons no FSII significa um acúmulo de Q_A^- , resultando no aumento do V_J devido a uma possível inibição do lado doador do FSII, situação comum para plantas que estão sob estresse (HALDIMAN e STRASSER, 1999; CHEN *et al.*, 2015, CAI *et al.*, 2016). Inversamente, os menores valores de F_0 e do ponto J independente do carboidrato adicionado no meio de cultura, indicam possivelmente que a energia absorvida seguiu a rota para redução de Q_A para Q_B^- fechando os centros de reação e assim, emitindo uma menor taxa de fluorescência.

O aumento de F_M e F_V nas plantas cultivadas com suplementação de carboidrato exógeno pode indicar uma maior eficiência na redução da

plastoquinona com menor perda de energia por dissipação não-fotoquímica (KALAJI *et al.*, 2014). Os maiores valores de F_M e F_V verificados nas plantas cultivadas com sacarose exógena podem estar relacionados ao papel fundamental da sacarose na proteção do FSII contra fotoinibição e estresse oxidativo, pois pode atuar como fonte de energia para síntese da proteína que atua nos cloroplastos quando estão sob algum tipo de estresse (DOWNS *et al.*, 1999).

Plantas que não receberam carboidrato no meio de cultura podem ter apresentado uma taxa fotossintética limitada, o que permite a sua sobrevivência por curto período de tempo devido ao consumo das reservas de carboidratos endógenos. Contudo, após esse período as plantas iniciam um processo de senescência devido ao desbalanço no consumo/produção de hidratos de carbono (MARTINS *et al.*, 2016b), como demonstrado pelo decréscimo de V_I e CS/ABS. Quando as folhas iniciam os processos de senescência, o número de centros de reação ativos são diminuídos, bem como os valores de V_I . Isto acarreta em alterações na capacidade de transferência de elétrons do lado doador e do lado receptor do centro de reação do FSII devido a esses processos inerentes da senescência foliar (WANG *et al.*, 2016).

Neste estudo a análise da cinética de fluorescência transiente permitiu a identificação de bandas L e de bandas K. Segundo Oukarroum *et al.*, (2009), é possível a utilização dessas bandas para a caracterização de distúrbios fisiológicos em plantas. A banda L é um indicativo da funcionalidade do FSII e está relacionada ao empilhamento e ao desempilhamento de tilacóides (STRASSER e STIRBET, 1998). Já a banda K está associada à atividade de doação de elétrons do complexo de evolução do oxigênio (CEO) para o FSII (STRASSER, 1997; GUHA *et al.*, 2013). Assim, o aparecimento de bandas negativas nas plantas suplementadas com carboidratos sugere que em condições de cultivo *in vitro* convencionais, as plantas mostraram ser de fato dependentes de qualquer fonte de carboidrato exógeno para a manutenção de suas funções vitais.

O cultivo *in vitro* influenciou na eficiência do fluxo de energia por seção transversal da folha. Os resultados mostraram alta absorção (ABS/ CS_M), captura (TR_0/CS_M), transporte (ET_0/CS_M) e baixa dissipação DI_0/CS_M quando as plantas de *B. zebrina* foram cultivadas com sacarose na concentração de 30 g L⁻¹. Isso

pode caracterizar maior eficiência do aparato fotossintético, pois a excitação das moléculas de clorofila foi absorvida, capturada sendo capaz de impulsionar um elétron para reduzir a feoftina, Q_A e os demais receptores da cadeia transportadora de elétrons. Tal condição permitiu um aumento em F_M , consequentemente aumento do F_V , e uma baixa dissipação de energia (ϕD_0).

A redução dos centros de reação ativos (CS/ABS) nas plantas que não receberam um carboidrato exógeno pode induzir maior dissipação de energia e susceptibilidade a fotoinibição (CHEN *et al.*, 2014; ZUSHI e MATSUZOE, 2017). Essa redução de CS/ABS pode indicar a senescência das plantas (WANG *et al.*, 2016), bem como a indução no aumento da dissipação de energia (ϕD_0 e DI_0/CS_M). Isso sugere um mecanismo de regulação negativa da fotossíntese para dissipação do excesso de energia absorvida e assim proteger dos possíveis fotodanos (KALAJI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016). Esses resultados enfatizam a importância da suplementação do meio de cultura com uma fonte exógena de carboidrato durante o cultivo *in vitro* convencional. Devido os carboidratos fornecerem energia para o metabolismo das plantas e agirem como reguladores que controlam a fisiologia, o metabolismo, o desenvolvimento e a expressão de genes que podem atuar na fotossíntese (MITA *et al.*, 1995; BADR e DESJARDINS, 2007; FERREIRA *et al.*, 2011; PESSONI *et al.*, 2015). Além de atuarem como reguladores osmóticos (HAZARIKA, 2003).

O aumento dos valores de M_0 para plantas sob cultivo *in vitro* sem adição de carboidrato sugere uma redução no fechamento dos centros de reação do FSII (WANG *et al.*, 2016; GOLTSEV *et al.*, 2016) indicando um possível retardo do fluxo de elétrons de Q_A para Q_B . Por outro lado, os valores de ϕP_0 e ϕE_0 nas plantas cultivadas com carboidrato exógeno, independentemente do tipo, podem indicar que a energia absorvida foi capturada e utilizada para reduzir a Q_A com menor perda de energia por dissipação (ϕD_0) (HERMANS *et al.*, 2003; OUKARROUM *et al.*, 2009). Os resultados mostram que o emprego de qualquer fonte de carboidrato (mono ou dissacarídeo) no cultivo *in vitro* é importante na manutenção do rendimento quântico do FSII, uma vez que não houve decréscimo de ϕP_0 , ϕE_0 ou acréscimo de ϕD_0 , mesmo quando empregado concentrações ditas altas como 45 g L^{-1} . Tendo em mente que a espécie em estudo acumula grande quantidade de frutose e glicose na parte aérea (MARTINS *et al.*, 2016b). O excesso desses monossacarídeos poderia reprimir genes relacionados ao

aparato fotossintético, pois podem afetar o sistema de sinalização de carboidratos (JANG, 1994; SHEEN, 1990; SHEEN, 1994; STITT *et al.*, 1995). Por outro lado, os monossacarídeos são importantes fontes de moléculas para constituintes estruturais bem como de energia, necessária para incitar processos bioquímicos. A diminuição no teor de monossacarídeos pode ser causada pela degradação dos pigmentos fotossintéticos, contribuindo para a diminuição da fotossíntese (PIOTROWSKA *et al.*, 2010).

As plantas cultivadas em meio de cultura sem a suplementação de carboidratos apresentaram ϕP_0 reduzido (0,55) muito menor que 0,75 o que sugere que as plantas estavam sob estresse, com prováveis danos no FSII e com uma regulação negativa da fotossíntese (MARTINS *et al.*, 2015; MATYSIAK e GABRYSZEWSKA, 2016). Para a maioria das plantas sob condições livres de estresse, o valor de ϕP_0 varia de 0,75 a 0,85 (BOLHÀR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989). Esta resposta de estresse foi evidenciada nos parâmetros de fluxo de energia, onde o ABS/CS_M , TR_0/CS_M , ET_0/CS_M , CS/ABS foram reduzidos e o DI_0/CS_M aumentado, mostrando que a falta de carboidrato no meio de cultura pode gerar debilitações nas plantas (MATILE, 1992; POURTAU *et al.*, 2006) e redução na eficiência fotossintética (MASCLAUX *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2015).

É sabido na literatura que os carboidratos podem ter efeito negativo sobre a fotossíntese durante o cultivo *in vitro* (BADR *et al.*, 2011; 2015; RIBEIRO *et al.*, 2017). Contudo os resultados de fluorescência da clorofila *a* sugerem que durante o cultivo convencional de *B. zebrina* o emprego de carboidratos é essencial para a manutenção das atividades do aparato fotossintético, sem causar danos no intervalo de concentração de carboidratos exógenos empregado (mesmo em concentrações mais elevadas). Assim também, outros autores mostraram que o carboidrato exógeno manteve o desempenho fotossintético de plantas *in vitro* (TICHA *et al.*, 1998; ECKSTEIN *et al.*, 2012; SAEZ *et al.*, 2016).

Os tratamentos também influenciaram nas estruturas anatômicas das folhas. Plantas de *B. zebrina* apresentaram estômatos na face abaxial das folhas como é descrito frequentemente para bromélias (PY, 1969; MANTOVANI *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2014) e como já documento para essa espécie por Martins *et al.*, (2015c; 2016a). O aumento progressivo da densidade de estômatos da região da base para o ápice das folhas pode ser explicado pelo fato de que em monocotiledôneas o crescimento das folhas ocorre de forma unidirecional, as

células são produzidas na região meristemática próximo à base da folha, e vão se afastando pelas próximas divisões e alongação das células (FRASER *et al.*, 1990; SKINNER e NELSON, 1994).

Na superfície foliar, a densidade estomática é um dos fatores mais importantes na detecção de estresse. Este é um parâmetro ecofisiológico muito importante que pode afetar a fotossíntese e as trocas gasosas (CAMARGO e MARENCO, 2011). Foi verificado que densidade de estômatos nas folhas de *B. zebrina* apresentou comportamento semelhante nas três regiões analisadas. O aumento no número de estômatos foi progressivo em função da concentração, seguido de decréscimo com 45 g L^{-1} . A adição de carboidratos no meio leva a alteração do potencial osmótico, o que conseqüentemente altera o fluxo de água a partir do meio de cultura para a planta (MARTINS *et al.*, 2016b). Déficits moderados de água podem ter efeitos positivos no número de estômatos em monocotiledôneas, mas déficits mais severos levam a uma redução, representando uma curva parábola quadrática (XU e ZHOU, 2008).

As plantas cultivadas com monossacarídeos apresentaram alterações no número ou no diâmetro dos vasos do xilema. Isso pode estar relacionado aos processos metabólicos que ocorrem naturalmente nas plantas, uma vez que a frutose e a glicose livres devem ser fosforiladas pela frutoquinase (FRK) ou hexoquinase (HXK) antes de serem metabolizadas mais adiante (GRANOT, 2007). Alguns genes codificadores de FRKs são essenciais no desenvolvimento do xilema e floema (DAMARI-WEISSLER *et al.*, 2009; STEIN *et al.*, 2016). A frutose como uma hexose não-fosforilada pode ser encontrada de forma mais abundante no tecido vascular, o que ressalta a importância das FRKs no desenvolvimento vascular (STEIN *et al.*, 2016). De forma semelhante, a glicose fosforilada, torna-se a UDP-glicose, que ao seguir a rota metabólica, entra na rota da biossíntese de hemicelulose por ação da uridina-difosfato-glicose-desidrogenase (UGDH). Esta enzima também está envolvida no desenvolvimento do xilema (LI *et al.*, 2017). Minha hipótese é que a alta concentração desses monossacarídeos transportados via xilema, a partir do meio de cultivo, induziu uma maior expressão dos genes codificadores de FRKs e UGDHs, que conseqüentemente influenciaram no desenvolvimento do xilema das plantas de *B. zebrina*.

As alterações no xilema observadas nas plantas cultivadas com monossacarídeos exógenos permitem maior eficiência no transporte de água. A maior densidade de vasos aumenta a área condutora de água (TYREE *et al.*, 1994). Já o maior diâmetro também garante potencial para conduzir maior volume de água em menor tempo, além de oferecer menor resistência ao fluxo hídrico (TYREE *et al.*, 1994; RODRÍGUEZ-GAMIR *et al.*, 2010). O aumento no transporte pode ter sido devido ao acúmulo de carboidratos solúveis nas folhas (MARTINS *et al.*, 2016b). Esse acúmulo de carboidratos aumenta a pressão osmótica na seiva do xilema favorecendo uma força motriz adicional para a absorção de água pela raiz (BOYER, 1985). O ajuste osmótico realizado pelas plantas no presente trabalho pode ter favorecido a manutenção do turgor e o volume celular, o que permitiu o crescimento semelhante para as plantas suplementadas com os três carboidratos.

Além disso, parece que os monossacarídeos são preferíveis para essa espécie, como verificado por Martins *et al.*, (2016). Muitas evidências indicam que sacarose é percebida como um sinal de açúcar distinto, que não pode ser substituído por glicose ou frutose, no controle de vários processos do desenvolvimento vegetal, bem como no armazenamento de carboidratos complexos em órgãos (LI e SHEEN, 2016). Já foi proposto que as FRKs possam desempenhar um papel fundamental na síntese do amido, assim como o aumento da atividade de duas enzimas chaves na biossíntese do amido, a ADP-glicose pirofosforilase e a amido-sintase (SCHAFFER e PETREIKOV, 1997).

As concentrações e as fontes de carboidratos tiveram impacto no enraizamento de *B. zebrina*. O processo de enraizamento demanda muita energia, e o maior número visualmente de raízes para plantas cultivadas com glicose deve-se a sua rápida e efetiva metabolização, que parece ser mais eficaz na indução de divisões mitóticas (BORISJUK *et al.*, 1998; CORRÊA *et al.*, 2005; ROLLAND *et al.*, 2006). Carboidratos como a glicose têm sido retratados como reguladores da expressão de componentes hormonais, além disso, esse carboidrato pode ter atividades semelhantes às de hormônios no processo de crescimento de raízes, proliferação celular e expansão foliar (GIBSON, 2004; YANAGLSAWA *et al.*, 2003; CHO *et al.*, 2006).

O maior peso de massa fresca para plantas obtido nesse trabalho para a concentração de 30 g L⁻¹ de carboidrato, exceto para frutose pode ser explicado

pela maior disponibilidade de carboidrato para fornecer energia e biomassa para as redes moleculares que impulsionam a divisão e extensão celular (LASTDRAGER *et al.*, 2014). Além de o carboidrato poder modular o metabolismo e o transporte de auxina em plantas (ROLLAND, 2006; FERREIRA *et al.*, 2011; LASTDRAGER *et al.*, 2014). A auxina é indispensável para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois promove a expansão celular (POWELL e LENHARD, 2012). No entanto, concentrações de carboidrato superiores a 30 g L^{-1} no meio de cultura podem induzir estresse osmótico em plantas cultivadas *in vitro* (CUI *et al.*, 2010). Quando as bromélias estão sob alguma condição de estresse, pode ocorrer a quebra da dominância apical e indução e proliferação de brotos laterais (PAULA e SILVA, 2000). Isto pode explicar os resultados obtidos com as plantas cultivadas com 45 g L^{-1} frutose. Essas plantas eram pequenas e com várias brotações laterais, o que evidencia maior nível de estresse em comparação a mesma concentração de sacarose ou glicose. Tal efeito culminou no maior acúmulo de massa fresca nas plantas desse tratamento.

8. CONCLUSÃO

As condições *in vitro* influenciaram o desempenho fotossintético e a anatomia de plantas de *Billbergia zebrina*. O uso de sacarose pode ter um melhor efeito no intervalo de concentração entre 15 e 30 g L^{-1} por não causar grandes mudanças no desempenho do aparato fotossintético e na anatomia das plantas. O desempenho do aparato fotossintético não diminui em função da concentração ou pelo tipo de carboidrato. Alterações no desenvolvimento dos vasos do xilema mostraram serem importantes para as adequações das condições microambientais quando empregado monossacarídeos no meio (menor potencial osmótico). O emprego de concentrações de 15 e 30 g L^{-1} de carboidratos garante maior número de estômatos nas folhas de *B. zebrina*. O incremento da massa fresca foi verificado em função do aumento da concentração de carboidratos adicionados no meio, seguida de decréscimo quando cultivadas com 45 g L^{-1} (glicose e sacarose).

9. REFERÊNCIAS

AFREEN, F. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants. *In*: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A (Eds.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system**, p. 61-90, 2005.

AKIN-IDOWU, P.E.; IBITOYE, D.O.; ADEMOYEGUN, O.T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 3782-3788, 2009.

BADR, A.; DESJARDINS, Y. Sugar Uptake and Metabolism in Tissue Cultured Potato Plantlets Cultured in Liquid Medium. **ISHS Acta Horticulturae**, v. 748, p. 265-273, 2007.

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Comprehensive analysis of *in vitro* to *ex vitro* transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, p. 491-508, 2015.

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, p.13-24, 2011.

BAKER, B. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.

BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.

BARROS, J.V.; COSTA, A.F. O gênero *Billbergia* Thunb. (Bromeliaceae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 1172-1192, 2008.

BELLINTANI, M.C.; LIMA, C.C.; BRITO, A.L.; SANTANA, J.R.F.; DORNELLES, A.L.C. Efeito da ventilação *in vitro* na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1098-1100, 2007.

BENNETT, B.C. **Ethnobotany of Bromeliaceae**. *In*: BENZING, D.H. Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. New York: Cambridge University Press, p. 245-328, 2000.

BENZ, B.W.; MARTIN, C.E. Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in 12 species of epiphytic Tillandsia (Bromeliaceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 648, 2006.

BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation.** USA, Cambridge University Press, p. 690, 2000.

BERTAMINIA, M.; MUTHUCHELIANB, K.; RUBINIGGA, M.; ZORERA, R.; VELASCOA, R.; NEDUNCHEZHIANA, N. Low-right temperature increased the photoinhibition of photosynthesis in grapevine leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v. 57, p. 25-31, 2006.

BESSION, J.C.F.; OLIVEIRA, L.K.; BONETT L.P.; E STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 8, p. 9-13, 2010.

BFG — Brazilian Flora Group Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

BLASING, O.E.; GIBON, Y.G.; UNTHERR, M.H.; OHNE, M.; MORCUENDE, R. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 17, p. 3257-3281, 2005.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R.; OQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E.G. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. **Functional Ecology**, v. 3, p. 497-514, 1989.

BORISJUK, L.; ROLLETSCHEK, H.; WOBUS, U.; WEBER, H. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 503-512, 2003.

BORISJUK, L.; WALENTA, S.; WEBER, H.; MUELLER-KLIESER, W.; WOBUS, U. High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. **The Plant Journal**, v. 15, p. 583-591, 1998.

BORKOWSKA, B.; SZCZERBA, J. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 911-915, 1991.

BOYER, J.S. Water transport. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 473-516, 1985.

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 16, p. 515-518, 1981.

BRIGHIGNA, L.; CECCHI-FIORDI, A.; PALANDRI, M. R. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. **Phytomorphology**, v. 34, p. 191-200, 1984.

CAI, W.; GAO, X.; HU, J.; CHEN, L.; LI, X.; LIU, Y.; WANG, G. UV-B radiation inhibits the photosynthetic electron transport chain in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Pakistan Journal of Botany**, v.48, p. 2587-2593, 2016.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, **ABCTP/EMBRAPA**, v. 1, p.87-132, 1998.

CAMARGO, M.A.B.; MARENCO, R.A. Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 41, p. 205-212, 2011.

CASANOVA, E.; MOYSSET, L.; TRILLAS, M.I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biologia Plantarum**, v. 52, p. 1-8, 2008.

CASSANA, F.F.; FALQUETO, A.R.; BRAGA, Eugenia, J.B; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A. Chlorophyll a fluorescence of sweet potato plants cultivated *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. **Brazilian Journal of Plant Physiology** (Impresso), v. 22, p. 167-170, 2010.

CHEN, S.G.; STRASSER, R.J.; QIANG, S. In vivo assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 84, p. 10-21, 2014.

CHEN, S.; KANG, Y.; ZHANG, M.; WANG, X.; STRASSER, R.J.; ZHOU, B.; QIANG, S. Differential sensitivity to the potential bioherbicide tenuazonic acid probed by the JIP-test based on fast chlorophyll fluorescence kinetics. **Environmental and Experimental Botany**, v.112, p. 1-15, 2015.

CHO, Y.H.; YOO, S.D.; SHEEN, J. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. **Cell**, v. 127, p. 579-589, 2006.

CHRISTENHUSZ, M.J.M.; BYNG, J.W. "The number of known plants species in the world and its annual increase" (PDF). **Phytotaxa**, v. 261, p. 201-217, 2016.

CHU, E.P.; TAVARES, A.R.; KANASHIRO, S.; GIAMPAOLI, P.; YOKOTA, E.S. Effects of auxins on soluble carbohydrates, starch and soluble protein content in *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 451-455, 2010.

COELHO, V.A.T.; Dias, G.M.G.; Rodas, C.L; Pasqual, M.; Ferreira, M.M.; Silva, M.L.S. Potassium, calcium and magnesium in tropical ornamental plants micropropagation. **Ornamental Horticulture**, v. 22, p. 74-80, 2016

CORRÊA, L.R.; PAIM, D.C.; SCHWAMBACH, J.; FETT-NETO, A.G. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, v. 45, p. 63-73, 2005.

CORREDOR-PRADO, J.P.; SCHMIDT, E.C.; GUERRA, M.P.; BOUZON, Z.L.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, p. 200-209, 2015.

COUEE, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.E.L.; AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 449-459, 2006.

CRAYN, D.M.; WINTER, K.; SMITH, A.C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 3703-3708, 2004.

CUI, X.H.; MURTHY, H.N.; WU, C.H.; PAEK, K.Y. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, p. 7-14, 2010.

DAMARI-WEISSLER, H.; RACHAMILEVITCH, S.; ALONI, R.; GERMAN, M.A.; COHEN, S.; ZWIENIECKI, M.A.; MICHELE HOLBROOK, N.; GRANOT, D. *LeFRK2* is required for phloem and xylem differentiation and the transport of both sugar and water. **Planta**, v. 230, p. 795-805, 2009.

DEBNATH, S.C. A two-step procedure for *in vitro* multiplication of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) shoots using bioreactor. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 88, p. 185-191, 2007.

DIAS, G.M.G.; SOARES, J.D.R.; PASQUAL, M.; SILVA, R.A.L.; RODRIGUES, L.C.A.; PEREIRA, F.J.; CASTRO, E.M. Photosynthesis and leaf anatomy of *Anthurium* cv. Rubi plantlets cultured *in vitro* under different silicon (Si) concentrations. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, p. 1160-1167, 2014a.

DOBRÁNSZKI, J.; MENDLER-DRIENYOVSZKI, N.M. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 1472-1478, 2014.

DOWNS, C.A.; RYAN, S.L.; HECKATHORN, S.A. The chloroplast small heat-shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 488-496, 1999.

EBURNEO, L.; RIBEIRO-JÚNIOR, N.G.; KARSBURG, I.V.; ROSSI, A.A.B.; SILVA, I.V. Anatomy and micromorphometric analysis of leaf *Catasetum x apolloi* Benelli & Grill with addition of potassium silicate under different light sources. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, p. 140-149, 2017.

ECKSTEIN, A.; ZIEBA, P.; GABRYS, H. Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* cultured *in vitro*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, p. 90-101, 2012.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P. de C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservacao *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 267-270, 2006.

FERREIRA, D.F. **Sisvar**: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, E.A.; PASQUAL, M.; REZENDE, J.C. Calogênese em plântulas de figueira. **Ceres**, v. 54, p. 112-117, 2015.

FERREIRA, W.M.; SUZUKI, R.M.; PESCADOR, R.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C. L.; KERBAUY, G.B. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium Second Love* (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 47, p. 420-427, 2011.

FRASER, T.E.; SILK, W. K.; ROST, T.L. Effects of low water potential on cortical cell length in growing regions of maize roots. **Plants Physiology**, v. 93, p. 648-651, 1990.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; OPEREZA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J.: Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve Field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 41, p. 69-76, 2005.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 263-285, 2002.

GEORGIEVA, K.; YORDANOV, I. Temperature dependece of chlorophyll fluorescence in pea thylacoid membranes. **Journal Plant physiology**, v. 142, p. 151-155, 1993.

GIBSON, S.I. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 253-264, 2004.

GOLTSEV, V.N.; KALAJI, H.M.; PAUNOV, M.; BAĞA, W.; HORACZEK, T.; MOJSKI, J.; KOCIEL, H.; ALLAKHVERDIEV, S.I. Variable Chlorophyll Fluorescence and its use for Assessing Physiological Condition of Plant Photosynthetic Apparatus. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 63, p. 881-907, 2016.

GOTTARDINI, E.; CRISTOFORI, A.; CRISTOFOLINI, F.; NALI, C.; PELLEGRINI, E.; BUSSOTTI, F.; FERRETTI, M. Chlorophyll-related indicators are linked to visible ozone symptoms: evidence from a field study on native *Viburnum lantana* L. plants in northern Italy. **Ecological Indicators**, v. 39, p. 65-74, 2014.

GRANOT, D. Role of tomato hexose kinases. **Functional Plant Biology**, v. 34, p. 564-570, 2007.

GREENWAY, M.B.; PHILLIPS, I.C.; LLOYD, M.N.; HUBSTENBERGER, J.F.; PHILLIPS, G.C. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 48, p. 403-410, 2012.

GUANTER, L.; ZHANG, Y.; JUNG, M.; JOINER, J.; VOIGT, M.; BERRY, J.A.; FRANKENBERG, C.; HUETE, A.R.; ZARCO-TEJADA, P.; LEE, J. E. Global and timeresolved monitoring of crop photosynthesis with chlorophyll fluorescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 1327-1333, 2014.

GUHA, A.; SENGUPTA, D.; REDDY, A.R. Polyphasic chlorophyll a fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 119, p. 71-83, 2013.

HABERLAND, G. Kultureversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Plant Tissue Culture**, v. 111 p. 69-92, 1902.

HALDIMAN, P.; STRASSER, R.J. Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.). **Photosynthesis Research**, v. 62, p. 67-83, 1999.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, p. 1704-1712, 2003.

HERMANS, C.; SMEYERS, M.; RODRIGUEZ, R.M.; EYLETTERS, M.; STRASSER, R.J.; DELHAYE, J-P. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 81-90, 2003.

HORTON, P.; RUBAN, A. Molecular Design of the Photosystem II Light-Harvesting Antenna: Photosynthesis and Photoprotection. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 365-373, 2005.

ISHIUCHI, T.; TORRES-PADILLA, M.E. Towards an understanding of the regulatory mechanisms of totipotency. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 23, p. 512-518, 2013.

JANG, J.C, Sheen J. Sugar sensing in higher plants. **Plant Cell**, v. 6, p. 1665-1679, 1994

JACQUES-FÉLIX, H. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcarnia feliciana*. *Selbyana*, v. 21, p. 118-124, 2000.

JO, E.A.; TEWARI, R.K.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 307-315, 2009.

KALAJI, H.M.; SCHANSKER, G.; LADLE, R.J. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issue. **Photosynthesis Research**, v. 122, p. 121-158, 2014.

KALAJI, M.H.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I.A.; CETNER, M.D.; ŁUKASIK, I.; GOLTSEV, V.; LADLE, R.J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiology Plantarum**, v. 38, p. 102, 2016.

KOCH, K.E. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 509-540, 1996.

KOCH, K.E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 235- 246, 2004.

KURITA, F.M.K.; MACHADO, B.M.; TEIXEIRA, N.B.; CESAR, C.G.A; NIEVOLA, C.C.; TAMAKI, V. Fenologia, cultivo *in vitro* e aclimatização da bromélia ameaçada de extinção *Nidularium minutum* Mez. **Biotemas**, v. 27, p. 59-69, 2014.

LASTDRAGER, J.; HANSON, J.; SMEEKENS, S. Sugar signals and the control of plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 799-807, 2014.

LEE, H.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, v. 78, p. 637-641, 1985.

LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of The American Society for Horticultural Science**, v.113, p.167-171, 1988.

LEE, T.Y.; WOO, S.Y.; KWAK, M.J.; INKYIN, K.; LEE, K.E.; JANG, J.H.; KIM, I.R. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence responses of *Populus sibirica* to water deficit in a desertification area in Mongolia. **Photosynthetica**, v. 54, p. 317-320, 2016.

LEMBRECHTS, R.; CEUSTERS, N.; DE PROFT, M.; CEUSTERS, J. Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 226-231, 2017

LEROY, C.; CARRIAS, J.F.; CÉRÉGHINO, R.; CORBARA, B. The contribution of microorganisms and metazoans to mineral nutrition in bromeliads. **Journal of Plant Ecology**, v. 9, p. 241-255, 2015.

LI, N.N.; CHEN, L.; LI, X.H.; LI, Q.; ZHANG, W.B.; TAKECHI, K.; TAKANO, H.; LIN, X.F. Overexpression of UDP-glucose dehydrogenase from *Larix gmelinii*

enhances growth and cold tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Biologia Plantarum**, v. 61, p. 95-105, 2017.

LI, L.; SHEEN, J. Dynamic and diverse sugar signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 33, p. 116-125, 2016.

LILLEY, J.L.S.; GEE, C.W.; SAIRANEN, I.; JUNG, K.; NEMHAUSER, J.L. An endogenous carbon-sensing pathway triggers increased auxin flux and hypocotyl elongation. **Plant Physiology**, v. 160, p. 2261-2270, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, p. 544, 2008.

LÜTTGE, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). **Annals of Botany**, London, v. 93, p. 629-652, 2004.

MALASPINA, P.; GIORDANI, P.; FAIMALI, M.; GARAVENTA, F.; MODENESI, P. Assessing photosynthetic biomarkers in lichen transplants exposed under different light regimes. **Ecological Indicators**, v. 43, p. 126-131, 2014.

MANTOVANI, A.; VENDA, A.K.L.; ALMEIDA, V.R.; COSTA, A.F.; FORZZA, R.C. Leaf anatomy of *Quesnelia* (Bromeliaceae): implications for the systematics of core bromelioids. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, p. 787-800, 2012.

MARTIN, C.E. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. **The Botanical Review**, v. 60, p. 1-82, 1994.

MARTINS, J.P.R.; PASQUAL, M.; MARTINS, A.D.; RIBEIRA, S.F. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, p. 85-91, 2015a.

MARTINS, J.P.R.; SCHIMILDT, E.R.; ALEXANDRE, R.S.; CASTRO, E.M.; NANI, T.F.; PIRES, M.F.; PASQUAL, M. Direct organogenesis and leaf-anatomy modifications *in vitro* of *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith (Bromeliaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, p. 2179-2187, 2014.

MARTINS, J.P.R.; SCHIMILDT, E.R.; ALEXANDRE, R.S.; FALQUETO, A.R.; OTONI, W.C. Chlorophyll a fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 51, p. 471-481, 2015b.

MARTINS, J.P.R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, P.; DE PROFT, M. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 121-132, 2015c.

MARTINS, J.P.R.; MARTINS, A.D.; PIRES, M.F.; BRAGA, R.A.J.; REIS, R.O.; DIAS, G.M.G.; PASQUAL, M. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled

microenvironment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, p. 43-57, 2016a.

MARTINS, J.P.R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, P.; DE PROFT, M. Physiological responses by *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) when grown under controlled microenvironmental conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p.1952-1961, 2016b.

MASCLAUX, C.; VALADIER, M.H.; BRUGIÈRE, N.; MOROT-GAUDRY, J. F.; HIREL, B. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. **Planta**, v. 211, p. 510-518, 2000.

MATILE, P. **Chloroplast senescence**. – Topics Photosynth, v. 12, p. 413-440, 1992.

MATYSIAK, B.; GABRYSZEWSKA, E. The effect of *in vitro* culture conditions on the pattern of maximum photochemical efficiency of photosystem II during acclimatisation of *Helleborus niger* plantlets to *ex vitro* conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, p. 585-593, 2016.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.

MITA, S.; SUZUKI-FUJII, K.; NAKAMURA, K. Sugar-Inducible Expression of a Gene for β -Amylase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 107, p. 895-904, 1995.

MOHAMED, M.; ALSADON, A.A. Influence of Ventilation and Sucrose on Growth and Leaf Anatomy of Micropropagated Potato Plantlets. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 295-300, 2010.

MOREIRA, M.A.; CARVALHO, J.G.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C.B.; SILVA, A.B. Efeito de substratos na aclimação de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 875-879, 2006.

MOREIRA, R.A.; RODRIGUES, F.A.; MONFORT, L.E.F.; PIRES, M.F.; PASQUAL, M. Diferentes meios de cultura no crescimento *in vitro* de sorvetão. **Agraria**, v. 7, p. 409-413, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473-497, 1962.

MURASHIGE. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURCHIE, E.H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 3983-3998, 2013.

MUSZYŃSKA, E.; HANUS-FAJERSKA, E. *In vitro* multiplication of *Dianthus carthusianorum* calamine ecotype with the aim to revegetate and stabilize polluted wastes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 631-640, 2017

NEGRELLE, R. R. B.; MITCHELL D.; ANACLETO, A. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, p. 91-100, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª. Ed. Artmed, Porto Alegre, p. 527, 2011.

OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 188-199, 2009.

PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de Bromélias**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2000.

PAUNOV, M.; KOLEVA, L.; VASSILEV, A.; VANGRONSVELD, J.; GOLTSEV, V. 2018. "Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat." **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 787, 2018.

PEREIRA, P.N.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 1067-1074, 2013.

PEREIRA, T.A.R.; SILVA, L.C.; AZEVEDO, A.A.; FRANCINO, D.M.T.; COSER, T. S.; PEREIRA, J.D. Leaf morpho-anatomical variations in *Billbergia elegans* and *Neoregelia mucugensis* (Bromeliaceae) exposed to low and high solar radiation. **Botany**, v. 91, p. 327-334, 2013.

PESSONI, R.A.; TERSAROTTO, C.C.; MATEUS, C.A.; ZERLIN, J.K.; SIMÕES, K.; DE CÁSSIA, L.; FIGUEIREDO- RIBEIRO, R.; BRAGA, M.R. Fructose Affecting Morphology and Inducing β -Fructofuranosidases in *Penicillium janczewskii*. **Springer Plus**, v. 4, p. 487, 2015.

PIOTROWSKA, A.; BAJGUZ, A.; GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ, B.; ZAMBRZYCKA, E. Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to cadmium and lead. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 594-604, 2010.

POURTAU, N.; JENNINGS, R.; PELZER, E.; PALLAS, J.; WINGLER, A. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 224, p. 556-568, 2006.

POWELL, A.E.; LENHARD, M. Control of organ size in plants. **Current Biology**, v. 22, p. 360-367, 2012.

PRIBIL, M.; LABS, M.; LEISTER, D. Structure and dynamics of thylakoids in land plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 1955-1972, 2014.

PY, C. **La piña tropical**. Barcelona: Blume, 1969. 278p.

PY, C.; LACOEUILHE, J.J.; TEISSON, C. **L'ananas, sa culture, ses produits**. Paris: G. P. Maisonneuve & Larose, 562p, 1984.

REIGOSA, R.M.J.; WEISS, O. **Fluorescence techniques, in Handbook of Plant Ecophysiology Techniques**, Reigosa, R.M., Ed., Dordrecht: Kluwer, p. 155-171, 2001.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. Flora Ilustrada Catarinense (R. Reitz, ed.)**. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, p. 1-559, 1983.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; MAGALHÃES FILHO, J.R.; LOBO, A.K.M.; MARTINS, M.O.; SILVEIRA, J.A. G.; YIN, X.; STRUIK, P.C. Increased sink strength offsets the inhibitory effect of sucrose on sugarcane photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 208, p. 61-69, 2017.

RODRIGUEZ, R.; ARAGÓN, A.; ESCALONA, M.; GONZÁLEZ, J.; DESJARDINS, Y. Carbon Metabolism in Leaves of Micropropagated Sugarcane during Acclimatization Phase. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 44, p. 533-539, 2008.

RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; INTRIGLILOLO, D.S.; PRIMO-MILLO, E.; FORNERGINER, M.A. Relationships between xylem anatomy, root hydraulic conductivity, leaf/root ratio and transpiration in citrus trees on different rootstocks. **Physiologia Plantarum**, v.139, p.159-169, 2010.

ROITSCH, T. Source-sink regulation by sugar and stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 198-206, 1999.

ROITSCH, T.; GONZALEZ, M. C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 606-613, 2004.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 675-709, 2006.

ROSA, W.S.; MARTINS, J.P.R.; RODRIGUES, E.S.; RODRIGUES, L.C. DE A.; GONTIJO, A.B.P.L.; FALQUETO, A.R. Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the *in vitro* multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, p. 339-350, 2018.

ROUSSEAU, C.; BELIN, É.; BOVE, E.; ROUSSEAU, D.; FABRE, F.; BERRUYER,

R.; GUILLAUMÈS, J.; MANCEAU, C.; JACQUES, M.; BOUREAU, T. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. **Plant Methods**, v. 9, p. 17, 2013.

RUAN, Y.L. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 33-67, 2014.

SAEZ, P.; BRAVO, L.; SAEZ, K.; SANCHEZ-OLATE, M.; LATSAGUE, M. RIOS, D. Photosynthetic and Leaf Anatomical Characteristics of *Castanea sativa* : A Comparison between *In Vitro* and Nursery Plants. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 15-24, 2012.

SÁEZ, P.L.; BRAVO, L.A.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; BRAVO, P.B.; RÍOS, D.G. Effect of photon flux density and exogenous sucrose on the photosynthetic performance during *In Vitro* culture of *Castanea sativa*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 2087-2105, 2016.

SCHAFFER, A.A.; PETREIKOV, M. Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation. **Plant Physiology**, v. 113, p. 739-746, 1997.

SCHUTTZ, R.; ARAÚJO, L.C.; SÁ, F.S. Bromélias: abrigos terrestres de vida de água doce na floresta tropical. **Natureza on line**, v. 10, p. 89, 2012.

SHEEN, J. Feedback-control of gene-expression. **Photosynthesis Research**, v. 39, p. 427-438, 1994.

SHEEN, J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **Plant Cell**, v. 2, p. 1027-1038, 1990.

SILVA, A.L.L.; COSTA, J.L.; ALCANTARA, G.B.; CARVALHO, D.C.; SCHUCK, M. R.; BIASI, L.A.; SCHEIDT, L. N.; SOCCOL, C.R. Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm (Bromeliaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, p. 1095-1101, 2012.

SIMÃO, M.J.; FARIA, D.V.; WERNER, E.T.; SOARES, T.C.B.; GONTIJO, A.B.P.L. Induction of *in vitro* shoots of *Billbergia euphemiae* E. Morren (Bromeliaceae) from leaf explants. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, p. 207-213, 2016.

SKINNER, R.H; NELSON, C.J. Epidermal cell division and the coordination of leaf and tiller development. **Annals of Botany**, v. 74, p. 9-16, 1994.

SLAZAK, B.; SLIWINSKA, E.; SAŁUGA, M.; RONIQUIER, M.; BUJAK, J.; SŁOMKA, A.; GORANSSON, U.; KUTA, E. Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, p 179-190, 2015.

SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 51, p. 49-81, 2000.

SMITH, A.M.; ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M. 2005. Starch degradation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 73-98, 2005.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Bromeliaceae, subfamily Bromelioideae. **Flora Neotropica**, p. 1493-2142, 1979.

STEFANOVA, M.A.; KOLEVA, D.P.; GANEVA, T.G.; DIMITROVA, M.A. Effect of plant growth regulators on the regeneration of *in vitro*-propagated *Lamium album* L. plants. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, 596 p. 1982-1985, 2011.

STEIN, O.; DAMARI-WEISSLER, H.; SECCHI, F.; RACHAMILEVITCH, S.; GERMAN, M.A.; YESELSON, Y.; AMIR, R.; SCHAFFER, A.; HOLBROOK, N.M.; ALONI, R.; ZWIENIECKI, M.A.; GRANOT, D. The tomato plastidic fructokinase *SIFRK3* plays a role in xylem development. **New Phytologist**, v. 209, p. 1484-1495, 2016.

STEINEMANN, S.; ZENG, Z.; MCKAY, A.; HEUER, S.; LANGRIDGE, P.; HUANG, C. Y. Dynamic root responses to drought and rewatering in two wheat (*Triticum aestivum*) genotypes. **Plant Soil**, v. 391, p.139-152, 2015.

STITT, M.; KRAPP, A.; KLEIN, D.; RÖPER-SCHWARZ, U.; PAUL, M. Do carbohydrates regulate photosynthesis and allocation by altering gene expression. *In* Madore, M. A.; Lucas, W. J. (Eds.), **Carbon Partitioning and Source-Sink Interactions in Plants**, p. 68-77, 1995.

STRASSER, B.J. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. **Photosynthesis Research**, v. 52, p. 147-155, 1997.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. *In*: P. Mathis (ed.), **Photosynthesis: from Light to Biosphere**. Springer Netherlands, p. 977-980, 1995.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of fluorescence transient, *In*: Papageogiou, G.; Govindjee. (eds.), **Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration**, Springer, Dordrecht, p. 321-362, 2004.

STRASSER, R.J.; STIRBET, A.D. Heterogeneity of photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll a fluorescence rise (O–J–I–P). **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 48, p. 3-9, 1998.

SU, T.; WOLF, S.; HAN, M.; ZHAO, H.; WEI, H.; GREINER, S. Reassessment of an *Arabidopsis* cell wall invertase inhibitor AtCIF1 reveals its role in seed germination and early seedling growth. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p. 137-155, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 820, 2009.

TANG, G.L.; LI, X.Y.; LIN, L.S.; ZENG, F.J.; GU, Z.Y. Girdling-induced *Alhagi sparsifolia* senescence and chlorophyll fluorescence changes. **Photosynthetica**, v. 53, p. 585, 2015

THORPE, T. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, p. 169-180, 2007.

TICHÁ, I.; CÁP, F.; PACOSVSKÁ, D.; HOFMAN, P.; HAISEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Culture on Sugar medium enhances photosynthesis capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 102, p. 155-162, 1998.

TYREE, M.T.; DAVIS, S.D.; COCHARD, H. Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? **International Association of Wood Anatomists Journal**, v. 15, p. 335-360, 1994.

VAN KOOTEN, O.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, p. 47-150, 1990.

VAN, H.J.M.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. **Plant Science**, v. 134, p. 21-30, 1998.

WANG, Q.Y.; ZHANG, J.; ZHAO, B. Z.; XIN, X.L.; DENG, X.H.; ZHANG, H. Influence of longterm fertilization on selenium accumulation in soil and uptake by crops. **Pedosphere**, v. 26, p. 120-129, 2016.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular physiology of legume seed development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 253-279, 2005.

WIND, J.; SMEEKENS, S.; HANSON, J. Sucrose: metabolite and signaling molecule. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1610-1614, 2010.

XU, Z.; Zhou, G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3317-3325, 2008.

YANAGLSAWA, S.; YOO, S.D.; SHEEN, J. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. **Nature**, v. 425, p. 521-525, 2003.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, IA. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2837-2849, 2013.

YU, R.; ZHANG, G.; LI H.; CAO, H.; MO, X.; GUI, M.; ZHOU, X.; JIANG, Y.; LI S.; WANG, J. *In vitro* propagation of the endangered tree fern *Cibotium barometz* through formation of green globular bodies. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 369-379, 2017

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428-1438, 2010.

ZHOU, R.; HYLDGAARD, B.; YU, X.; ROSENQVIST, E.; UGARTE, R.M.; YU, S .; WU, Z.; OTTOSEN CARL-OTTO.; ZHAO, T. Phenotyping of faba beans (*Vicia faba* L.) under cold and heat stresses using chlorophyll fluorescence. **Euphytica**, v. 214, p. 68, 2018.

ZUSHI, K.; MATSUZOE, N. Using of chlorophyll a fluorescence OJIP transients for sensing salt stress in the leaves and fruits of tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 216-221, 2017.