



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM
RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**



BÁRBARA PAULA DOS SANTOS BORGES

**TRAÇOS MORFOFUNCIONAIS, REGENERAÇÃO *IN VITRO* E
BIOQUÍMICA DE ESPÉCIES DE *VELLOZIA*
SOB DISTÚRBIOS POR SECA, ALTA TEMPERATURA E FOGO**

BÁRBARA PAULA DOS SANTOS BORGES

**TRAÇOS MORFOFUNCIONAIS, REGENERAÇÃO IN VITRO E
BIOQUÍMICA DE ESPÉCIES DE VELLOZIA
SOB DISTÚRBIOS POR SECA, ALTA TEMPERATURA E FOGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Abel Augusto Conceição
Co-orientação: Profa. Dra. Alone Lima-Brito

Feira de Santana, 2022

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

B73 Borges, Bárbara Paula dos Santos
 Traços morfofuncionais, regeneração *in vitro* e bioquímica de espécies de
Vellozia sob distúrbios por seca, alta temperatura e fogo / Bárbara Paula dos
Santos Borges.-Feira de Santana, 2022
 112 p.: il.
 Orientador: Abel Augusto Conceição
 Coorientadora: Alone Lima-Brito
 Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2022.

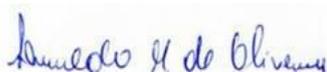
1. Flores rupestres -Velloziaceae 2. Velloziaceae - Multiplicação *in vitro*. 3. Velloziaceae - Estresse térmico. 4. Velloziaceae - Osmorreguladores. I. Conceição, Abel Augusto, orient. II. Lima-Brito, Alone, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.576.1

**BANCA EXAMINADORA
(DOUTORADO)**



Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani
(Universidade Federal da Bahia – UFBA)



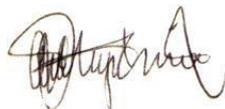
Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Profa. Dra. Maria Angélica de Pereira Carvalho Costa
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)



Profa. Dra. Sâmia Paula Santos Neves Oliveira
(Universidade Salvador - UNIFACS)



Prof. Dr. Abel Augusto Conceição
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

A meus pais Antônio Mario e Solange Borges pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos amigos espirituais pelo direcionamento e inspirações ao longo do doutorado.

A meus pais que sempre me incentivaram e auxiliaram na busca por todos os meus objetivos.

Aos alunos de iniciação científica Naron, Tainah, Verônica e Akemi pelo auxílio no laboratório e excursões em campo. Além de tantos outros colegas que ajudaram a concluir a etapa de coleta como Dinah, Erica, Liliane, Gerson (Limão), Lucimara, Juliana e Ivo, que possibilitaram a conclusão dessa parte da pesquisa e momentos de muitas resenhas.

Agradeço a Sâmia pela disposição em ajudar na organização da coleta ou em qualquer outra dúvida sobre o laboratório de Flora e Vegetação (FLOVE).

Aos amigos do laboratório de Cultura de Tecido Vegetal (LCTV), entre eles Junior, Dinah, Mauricio, Andressa, Fernanda que cercaram essa caminhada com discussões sobre as pesquisas e resenhas tornando a caminhada mais leve. Sou grata a amizade desenvolvida ao longo do doutorado com os colegas de turma, em especial a Bárbara e Luma. E aos amigos que mesmo longe torceram e compreenderam a minha ausência em muitos momentos Laisa, Lilian, Larissa, Emile.

A meu noivo Arsene pela compreensão das ausências e pelo apoio nos momentos finais com a ansiedade e estresse.

Não poderia deixar de agradecer o apoio do Projeto Sempre Viva pela disponibilidade do alojamento para as coletas. Além de expressar minha gratidão à Marcelo, pelos vários auxílios em campo com informações das trilhas e caronas para efetuar meu trabalho.

A Robson pela disponibilidade e auxílio na análise de prolina.

A minha coorientadora, professora Dra. Alone Lima Brito por tantos ensinamentos, palavras de incentivo e apoio.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Abel Conceição pela confiança, paciência, incentivos e ensinamentos nesses quatro anos.

Por fim agradeço as instituições que possibilitaram o desenvolvimento da pesquisa; a Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de doutorado; a Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) pela estrutura física/equipamentos; e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMbio) pelo fornecimento de autorização.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - CAPES - Finance Code 001)".

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou ainda sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO GERAL

Os traços morfofuncionais permitem aprofundar o conhecimento sobre as respostas dos vegetais a distúrbios como fogo e seca, fatores que caracterizam o campo rupestre, onde a família Velloziaceae se destaca pela abundância e adaptações a estresses abióticos. Objetivou-se avaliar traços morfofuncionais relacionados aos filtros ambientais fogo ou seca, o impacto desses estresses abióticos na bioquímica e na multiplicação *in vitro* de espécies do gênero *Vellozia*. Nesse intuito, foram marcados 10 indivíduos das seis espécies para mensuração de traços morfofuncionais e 10 plantas de *V. pyrantha* e *V. seubertiana* para avaliação de rosetas regeneradas e novas. No laboratório foi avaliado o crescimento inicial *in vitro* em concentrações de meio de cultura MS, sacarose e carvão ativado, a multiplicação *in vitro* por estresse osmótico com polietilenoglicol, sacarose e manitol e o estresse térmico (140 ± 3 °C) utilizando estufa de secagem. Houve separação em dois grupos de acordo com as características relacionadas a seca e fogo. *V. seubertiana* teve maiores médias de regeneração e rebrota. O MS reduzido em nutriente com 15g de sacarose favoreceu o crescimento inicial *in vitro*. O estresse hídrico induziu brotos em *V. pyrantha* e o térmico em *V. punctulata*. A formação de grupo coeso dos indivíduos de afloramento rochoso e entre as espécies de ambiente contínuo indica *tradeoff* entre seca e fogo. O sucesso do estabelecimento *in vitro* de *Vellozia* depende da composição do meio de cultura e o estresse osmótico e térmico foram eficientes na indução de reprodução vegetativa *in vitro* em *V. pyrantha* e *V. punctulata*.

Palavras-chave: Campo rupestre. Cultivo *in vitro*. Osmorreguladores. Velloziaceae. Estresse térmico.

ABSTRACT

The morphofunctional traits make it possible to deepen the knowledge about the responses of plants to disturbances such as fire and drought, factors that characterize the rocky field, where the Velloziaceae family stands out for its abundance and adaptations to abiotic stresses. The objective was to evaluate morphofunctional traits related to environmental filters fire or drought, the impact of these abiotic stresses on the biochemistry and *in vitro* multiplication of species of the genus *Vellozia*. For this purpose, 10 individuals of the six species were marked to measure morphofunctional traits and 10 plants of *V. pyrantha* and *V. seubertiana* to evaluate regenerated and new rosettes. In the laboratory, initial growth was evaluated *in vitro* at concentrations of MS culture medium, sucrose and activated charcoal, *in vitro* multiplication by osmotic stress with polyethylene glycol, sucrose and mannitol and thermal stress (140 ± 3 °C) using a drying oven. There was separation into two groups according to the characteristics related to drought and fire. *V. seubertiana* had higher averages of regeneration and regrowth. The nutrient reduced MS with 15g of sucrose favored the initial growth *in vitro*. Water stress induced shoots in *V. pyrantha* and thermal stress in *V. punctulata*. The formation of a cohesive group of individuals from rocky outcrops and between species of continuous environment indicates a *tradeoff* between drought and fire. The success of the *in vitro* establishment of *Vellozia* depends on the composition of the culture medium and the osmotic and thermal stress were efficient in inducing *in vitro* vegetative reproduction in *V. pyrantha* and *V. punctulata*.

Keywords: Rupestrian grasslands. *In vitro* cultivation. Osmoregulators. Velloziaceae. Thermal stress.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1 - Traços morfofuncionais em espécies de <i>Vellozia</i> sob fogo e seca	
1.1 Introdução	24
1.2 Material e Métodos	26
1.2.1 Área de estudo	26
1.2.2 Coleta.....	26
1.2.3 Traços morfofuncionais de seis espécies de <i>Vellozia</i> sob seca e fogo	27
1.2.4 Influência do fogo na capacidade reprodutiva e regeneração de duas espécies de <i>Vellozia</i>.....	28
1.2.5 Mensuração dos parâmetros.....	29
1.2.6 Análise estatística	30
1.3 Resultados.....	31
1.4 Discussão.....	39
1.5 Conclusão.....	42
1.6 Referências.....	43
CAPÍTULO 2 - Crescimento inicial <i>in vitro</i> de espécies de <i>Vellozia</i> da Chapada Diamantina.	
2.1 Introdução	49
2.2 Material e Métodos	51
2.2.1 Velloziaceae e campo rupestre.....	51
2.2.2 Coleta de sementes	51
2.2.3 Condições de cultivo	51
2.2.4 Desinfestação das sementes.....	52
2.2.5 Composição do meio de cultura no crescimento inicial de <i>Vellozia</i>.....	52

2.2.6	Varáveis analisadas	53
2.2.7	Análise estatística	53
2.3	Resultados e Discussão	54
2.4	Conclusão	58
2.5.5	Referências	59

CAPÍTULO 3 - Estresse hídrico como indutor de multiplicação *in vitro* em quatro espécies de *Vellozia* da Chapada Diamantina.

3.1	Introdução	64
3.2	Material e métodos	66
3.2.1	Espécies estudadas	66
3.2.2	Condições de cultivo	66
3.2.3	Coleta das sementes.....	66
3.2.4	Germinação <i>in vitro</i>	67
3.2.5	Efeito do estresse hídrico utilizando sacarose combinada com manitol na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Vellozia</i>	67
3.2.6	Efeito do estresse hídrico com polietilenoglicol (PEG ₆₀₀₀) na multiplicação <i>in vitro</i> , no conteúdo relativo de água foliar (CRAf) e de prolina.....	68
3.2.7	Variáveis analisadas.....	68
3.2.8	Análise estatística	68
3.3	Resultados	70
3.4	Discussão	76
3.5	Conclusão.....	79
3.6	Referências	80

CAPÍTULO 4 - Estresse térmico na multiplicação *in vitro* e bioquímica em quatro espécies de *Vellozia* da Chapada Diamantina

4.1	Introdução	86
4.2	Material e métodos.....	88
4.2.1	Condições de cultivo.....	88
4.2.2	Coleta das sementes.....	88
4.2.3	Germinação <i>in vitro</i>	88

4.2.4 Efeito do estresse térmico na multiplicação <i>in vitro</i> , no conteúdo relativo de água foliar (CRAf) e de prolina	89
4.2.5 Variáveis analisadas	90
4.2.6 Análise estatística	90
4.3 Resultados.....	91
4.4 Discussão.....	95
4.5 Conclusão	97
4.6 Referências	98
CONCLUSÃO GERAL	99
APÊNDICE A - CAPÍTULO 1 - Traços morfofuncionais em espécies de <i>Vellozia</i> sob fogo e seca.....	102
APÊNDICE B - CAPÍTULO 2 - Crescimento inicial <i>in vitro</i> de espécies de <i>Vellozia</i> da Chapada Diamantina.....	105
APÊNDICE C – CAPÍTULO 3 - Estresse hídrico como indutor de multiplicação <i>in vitro</i> em quatro espécies de <i>Vellozia</i> da Chapada Diamantina.....	107
APÊNDICE D – CAPÍTULO 4 - Estresse térmico na multiplicação <i>in vitro</i> e bioquímica em quatro espécies de <i>Vellozia</i> da Chapada Diamantina.....	109

INTRODUÇÃO GERAL

O estudo de traços funcionais de vegetais permite conhecer a estrutura e formação da comunidade (VIOLLE et al., 2007; LOIOLA et al., 2010), pois essas características estão ligadas ao crescimento, reprodução e sobrevivência da planta (VIOLLE et al., 2007). Diante da heterogeneidade ambiental as espécies possuem diferentes formas de exploração do espaço se estabelecendo no local mais vantajoso, de modo que é compreensível vincular traços funcionais, ou seja, a morfologia, fisiologia ou fenologia do indivíduo ao habitat (WRIGHT et al., 2010; GE et al. 2019). Diversas características têm sido documentadas para avaliar a relação entre vegetais e ambiente abiótico como a área foliar, diâmetro do caule, suculência da folha e altura da planta (LOIOLA et al., 2010; RATNAM et al., 2019; ASSUNÇÃO et al., 2020; MAKUMBE et al., 2020), as quais podem ser relacionados a filtros ambientais como os estresses abióticos provocados por fogo e seca (KRAFT et al., 2015).

O fogo apresenta inegável importância como modificador ambiental, sendo seu regime responsável pela distribuição e características ecológicas de alguns dos principais biomas do mundo compondo ecossistemas como pastagens e savanas (BOND et al., 2005). O impacto do fogo é frequentemente discutido na literatura por meio da resiliência dos vegetais, os quais sobrevivem devido a adaptações como gemas subterrâneas, protegidas por bainhas foliares ou por folhas em forma de roseta, espessura da casca e rebrota (CLARKE et al., 2013; VESK; YEN, 2019; DIOS, 2020; ZUPO et al., 2020). Essas espécies resistentes ao fogo podem ser consideradas adaptadas a determinado regime de fogo e são chamadas de plantas pirofíticas (COUTINHO, 2002; KEELEY et al., 2011; PAUSAS; KEELEY, 2017).

Outro extremo adaptativo é o das plantas tolerantes a dessecação, vegetais que convivem com a seca, capazes de equilibrar seu metabolismo à baixa disponibilidade hídrica do ambiente e retomar seu funcionamento normal após reidratação (HOPKINS, 1999; ALPERT, 2000; DINAKAR et al., 2012). Tais plantas podem sobreviver à dessecação de 80 a 95% das suas células e são denominadas de “plantas que ressuscitam” (POREMBSKI; BARTHLOTT, 2000; ALCANTARA et al., 2015). A seca e o calor estão entre os estresses abióticos que mais influenciam modificações nos mecanismos fisiológico, bioquímico, ecológico e molecular dos vegetais, sendo selecionada a alteração que favorece a manutenção do equilíbrio celular e a sobrevivência em condições de estresse (ALCAZAR, 2006; SALEHI-LISAR; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, 2016). No entanto, essas alterações podem induzir lesões celulares graves que interferem no crescimento e produtividade do vegetal (BITA;

GERATS, 2013), e causar danos provavelmente minimizados com a produção e acúmulo de solutos osmoprotetores (TAIZ et al. 2017). A ação dessas substâncias auxilia na redução do potencial hídrico da planta entre elas estão os carboidratos (DINAKAR et al., 2012; TAIZ et al. 2017), a prolina a mais difundida que atua ainda no combate aos radicais livres (ASHRAF; FOOLAD, 2007; MOLINARI et al., 2007) e as poliaminas também com ação antioxidante (ESQUIVEL-LUNA et al., 2014).

A tolerância à dessecação e a resistência ao fogo podem ser observadas em algumas espécies de Velloziaceae (CONCEIÇÃO et al., 2016) família de monocotiledôneas que concentra suas espécies no campo rupestre, onde a maioria é endêmica (MELLO-SILVA, 2011, 2018). O campo rupestre é caracterizado por modificações edafoclimáticas como alta radiação, ventos fortes e solos extremamente pobres, além de ser marcado por incêndios frequentes e secas periódicas o que possibilitou o desenvolvimento de uma vegetação altamente adaptada a estresses (FERNANDES, 2016; SILVEIRA et al., 2016). A heterogeneidade de habitat é outra característica marcante do campo rupestre, formando uma composição ambiental complexa que reflete na riqueza de espécies e possibilita a observação da atuação de estresses abióticos em habitat circunvizinhos como os afloramentos rochosos e a vegetação contínua (CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005, 2016).

No afloramento rochoso podem ser encontradas diversas espécies adaptadas a dessecação como a *Vellozia punctulata* Seub, *Vellozia jolyi* L.B.Sm & Ayensu e *Vellozia hemisphaerica* Seub (CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; CONCEIÇÃO et al., 2007; NEVES, 2009; MELLO-SILVA, 2015), contrastando à vegetação contínua com estrato de plantas graminóides sob ação frequente do fogo, ambiente onde ocorre a *Vellozia seubertiana* Goethart & Henrard que apresenta indícios de floração provocada pelo fogo (NEVES, 2009), e as espécies endêmicas da Chapada Diamantina, BA *Vellozia pyrantha* A.A.Conc., dependente do fogo para a reprodução e a espécie de grande porte *Vellozia sincorana* L.B.Sm & Ayensu, ocorrente nas margens de rios ou encostas rochosas de morros (CONCEIÇÃO et al., 2016; CONCEIÇÃO, 2018) (Figura 1).

Essas espécies ainda são pouco estudadas. Há apenas pesquisa fenológica de *V. hemisphaerica*, *V. jolyi* e *V. seubertiana* (CONCEIÇÃO et al., 2007; NEVES, 2009), e relatos sobre a propagação *in vitro* de *Vellozia pyrantha* (BORGES et al., 2020).

O cultivo *in vitro* de plantas, uma das áreas de elevado sucesso da biotecnologia, pode ser utilizado como caminho para a propagação das espécies e possibilita seu estudo fisiológico e bioquímico, tornando os avanços na pesquisa mais rápidos e eficientes devido ao ambiente

de cultivo controlado e ao curto período para visualização da resposta dos vegetais (CANÇADO et al., 2009). Dentre as diversas técnicas do cultivo *in vitro*, a mais difundida é a micropropagação, que proporciona o desenvolvimento de plantas livres de contaminação, produção de grande quantidade de clones em espaço reduzido e multiplicação de espécies de difícil propagação (OLIVEIRA et al., 2007).



Figura 1 – Seis espécies do gênero *Vellozia* em ambiente contínuo (fogo) *Vellozia seubertiana* (A e B), *Vellozia sincorana* (C e D) e *Vellozia pyrantha* (E e F), e afloramento rochoso (seca) *Vellozia punctulata* (G e H), *Vellozia jolyi* (I e J) e *Vellozia hemisphaerica* (L e M). Fotos BPS BORGES

No estabelecimento *in vitro*, primeira fase da técnica de micropropagação, a seleção e desinfestação eficiente do explante, assim como a composição do meio de cultura é de extrema importância (GEORGE; DEBERGH, 2008; GEORGE; KLERK, 2008). Além dos nutrientes minerais diversas substâncias podem ser acrescentadas ao meio, como a sacarose

para fornecer esqueleto de carbono e energia metabólica e o carvão ativado com poder de absorção de substâncias tóxicas desfavoráveis ao enraizamento (CALDAS et al., 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; FLORES et al., 2013).

A fase de multiplicação tem como objetivo maximizar o número de brotos, sendo normalmente utilizados reguladores de crescimento como o balanço entre citocininas e auxinas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). No entanto, a produção de brotos tem sido investigada utilizando o estresse como gatilho para reprodução vegetativa como observado na regeneração *in vitro* em *Vellozia pyrantha* pelo uso de estresse com fogo (BORGES et al., 2020). O estresse hídrico *in vitro* também foi analisado para indução de brotos em *Vaccinium corymbosum* L. (CAO et al., 2003) e *Solanum tuberosum* L. (VINTERHALTER et al., 1997). Dentre os compostos com ação osmorregulatória estão o manitol, o sorbitol e o polietilenoglicol, os quais dependendo da concentração, podem provocar estresse hídrico e modificações nas respostas fisiológicas dos vegetais (MORAES; MENEZES, 2003).

Tendo em vista que filtros ambientais como fogo e seca podem moldar características morfofuncionais com seleção das mais vantajosas suprimindo as impróprias, e que as espécies vegetais nesses ambientes tendem a investir em mecanismos bioquímicos de proteção e na regeneração vegetativa como forma de reprodução (KEDDY, 1992; MARTINELLI, 2008; CLARKE et al., 2013; ZEPPEL et al., 2015; ALEEM et al., 2020; CHOMICKI, 2021), hipotetizamos que o fogo recorrente em ambiente contínuo tem influência nos traços morfofuncionais de *Vellozia seubertiana*, *Vellozia sincorana* e *Vellozia pyrantha*, e a seca sazonal em afloramentos rochosos nas características de *Vellozia punctulata*, *Vellozia jolyi* e *Vellozia hemisphaerica*, assim como ambos induziriam mecanismos bioquímicos de proteção e a reprodução vegetativa *in vitro* dessas espécies. Adicionalmente avaliamos se o crescimento inicial *in vitro* de *Vellozia* corresponde a pobreza nutricional do campo rupestre com diferentes concentrações de meio de cultura.

Dado o exposto, nosso objetivo foi analisar os traços morfofuncionais de seis espécies de *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo recorrente) e afloramento rochoso (seca predominante), a capacidade reprodutiva e regeneração de *Vellozia pyrantha* e *Vellozia seubertiana* após a passagem de fogo, além da resposta bioquímica e propagação vegetativa *in vitro* de quatro espécies utilizando o estresse hídrico e térmico como gatilhos. Nesse intuito este estudo foi dividido em quatro capítulos:

- o No capítulo 1 abordamos atributos morfofuncionais em seis espécies de *Vellozia* sob fogo (*V. pyrantha*, *V. seubertiana* e *V. sincorana*) e seca (*V. punctulata*, *V. jolyi*, *V.*

hemisphaerica), além da capacidade reprodutiva e regenerativa de *V. pyrantha* e *V. seubertiana* após contato direto com fogo.

- o No capítulo 2 avaliamos a influência de diferentes concentrações de meio de cultura no crescimento inicial *in vitro* de *V. seubertiana*, *V. sincorana*, *V. jolyi* e *V. punctulata*.
- o No capítulo 3 observamos a influência do estresse hídrico na bioquímica e indução de multiplicação *in vitro* de *V. pyrantha*, *V. seubertiana*, *V. jolyi* e *V. punctulata* com utilização de osmorreguladores.
- o No capítulo 4 avaliamos o efeito da alta temperatura (140 ± 3 °C) na resposta bioquímica e capacidade de multiplicação *in vitro* de *V. pyrantha*, *V. seubertiana*, *V. jolyi* e *V. punctulata*.

REFERÊNCIAS

- ALCAZÁR, R. et al. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. **Biotechnology Lett**, v. 28, p. 1867-1876, 2006.
- ALCANTARA, S. et al. Carbon assimilation and habitat segregation in resurrection plants: a comparison between desiccation and non-desiccation-tolerant species of Neotropical Velloziaceae (Pandanales). **Functional Ecology**, v. 29, p. 1499-1512, 2015.
- ALEEM, S. et al. Heat tolerance in vegetables in the current genomic era: an overview. **Plant Growth Regulation**, v. 92, p. 497-516, 2020.
- ALPERT, P. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**, v.151, p. 5-17, 2000.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.
- ASSUNÇÃO, V. A. Environmental filters structure plant communities in the Brazilian Chaco. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 746-754, 2020.
- BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Plant science**, v. 4, p. 1-18, 2013.
- BORGES, B. P. S. Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 709-713, 2020.
- BOND, W. J; WOODWARD, F. I; MIDGLEY, G. F. The global distribution of ecosystems in a world without fire. **New Phytologist**, v. 165, p. 525-538, 2005.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES. A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA, 1998. p.87-131.
- CANÇADO, G. M. A. et al. Cultivo *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, v. 30, p. 64-74, 2009.
- CAO, X. et al. Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 255-259, 2003.
- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica**, v. 23, p. 85-111, 2005.
- CONCEIÇÃO, A. A. PIRANI, J. R, MEIRELLES, S. T. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of “Chapada Diamantina”, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 641-656, 2007.

- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Succession on the Rocky Outcrop Vegetation: A Rupestrian Grassland Scheme. In: FERNANDES, G. W. **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**, 2016. p. 181-206.
- CONCEIÇÃO, A. A.; RAPINI, A.; CARMO F. F.; BRITO, J. C.; SILVA, G. A.; NEVES, S. P. S.; JACOBI, C. M. Rupestrian Grassland Vegetation, Diversity, and Origin. In: FERNANDES, G. W. **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**, 2016. p. 105-127.
- CONCEIÇÃO, A. A. A hot case for conservation: Candomba (*Vellozia pyrantha*), a flammable plant endemic to a national park is used to make a fire and threatened by fire suppression policy. **Journal for Nature Conservation**, v. 45, p. 118-121, 2018.
- COUTINHO, M. L. O bioma Cerrado. In: Aldo L. K. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, 2002. p. 68-82.
- CHOMICKI, G. Bringing Raunkiaer with plant architecture: unveiling the climatic drivers of architectural evolution in *Euphorbia*. **New Phytologist**, v. 231, p. 910-912. 2021.
- CLARKE, P. J. et al. Resprouting as a key functional trait: how buds, protection and resources drive persistence after Fire. **New Phytologist**, v. 197, p. 19-35, 2013.
- DINAKAR, C.; DIJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012.
- DIOS, V. R. Effects of Fire on Plant Performance. In: _____ **Plant-Fire Interactions Applying Ecophysiology to Wildfire Management**. Springer Nature Switzerland, 2020. p. 117-175.
- ESQUIVEL-LUNA, E. N. et al. Poliaminas como indicadores de estrés en plantas. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 20, p. 283-295, 2014.
- FERNANDES, G. W. The Megadiverse Rupestrian Grassland. In: _____. **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**, 2016. p. 3-14.
- FLORES, R. et al. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, p. 192-199, 2013.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA. 1998. p. 183-260.
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. (Eds.), *Plant propagation by tissue culture*. Springer: Dordrecht. 2008. p. 29-64.

GEORGE, E. F.; KLERK, G. J. The components of plant tissue culture media: macro and micro-nutrients. In: GEORGE, E. F., HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. (Eds.), Plant propagation by tissue culture. Springer: Dordrecht. 2008. p. 65-113.

GE, X-Y. M. Functional trait trade-off and species abundance: insights from a multi-decadal study. **Ecology Letters**, v. 22, p. 583-592, 2019.

HOPKINS, G. W. **Introduction to plant physiology**. New York City, Published by John Wiley & Sons, Inc., 1999. 528p.

KEDDY, P. A. Assembly and response rules: two goals for predictive community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 3, p. 157-164, 1992.

KRAFT, N. J. B. et al. Community phylogenetics and ecosystem functioning: Community assembly, coexistence and the environmental filtering metaphor. **Functional Ecology**, v. 29, p. 592-599, 2015.

KEELEY, J. E. et al. Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 406-411, 2011.

LOIOLA, P. P. et al. Functional diversity of herbaceous species under different fire frequencies in Brazilian savanas. **Flora**, v. 205, p. 674-681, 2010.

MAKUMBE, P. et al. Effects of Fire Frequency on Woody Plant Composition and Functional Traits in a Wet Savanna Ecosystem. **International Journal of Ecology**, v. 2020, p.1-11, 2020.

MARTINELLI, T. In situ localization of glucose and sucrose in dehydrating leaves of *Sporobolus stapfianus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 580-587, 2008.

MELLO-SILVA, R. et al. Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology. **Annals of Botany**, v. 108, p. 87-102, 2011.

MELLO-SILVA, R. Velloziaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

MELLO-SILVA, R. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Velloziaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 259-262, 2018.

MORAES, G. A. F.; MENEZES, N. L. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. **Ciência Rural**, v. 33, p. 219-226, 2003.

MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 218-229, 2007.

NEVES, S. P. S. **Fenologia, biologia floral e polinização de espécies de Velloziaceae endl. em área de campo rupestre na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil**. 2009, 67p. Dissertação (Botânica) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.

OLIVEIRA, M. F. F. et al. Micropropagação de mimosa *Caesalpinia efolia Benth.* a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, v. 20, p. 152-159, 2007.

- PAUSAS, J. G.; KEELEY, J. E. Epicormic Resprouting in Fire-Prone Ecosystems. **Trends in Plant Science**, v. 22, p. 1008-1015, 2017.
- POREMBSKI, A.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as center of diversity desiccation-tolerant vascular plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 19-28, 2000.
- RATNAM, J. Functional traits of trees from dry deciduous ‘forests’ of southern India suggest seasonal drought and fire are important drivers. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 1-12, 2019.
- SILVEIRA et al. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant and Soil**, v. 403, p.129-152, 2016.
- SALEHI-LISAR, S. Y.; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, H. Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance. In: SALEHI-LISAR, S. Y.; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, H. **Drought Stress Tolerance in Plants**. Springer International, 2016. p. 1-16.
- VIOLLE, C. et al. Let the concept of trait be functional! **Oikos**, v. 116, p. 882-892, 2007.
- VINTERHALTER, D.; VINTERHALTER, B.; CALOVIC, M. The relationship between sucrose and cytokinins in the regulation of growth and branching in potato cv. désiree shoot cultures. **Acta Horticulturae**, v. 462, p. 319-323, 1997.
- VESK, P. A; YEN, J. D. L. Plant resprouting: How many sprouts and how deep? Flexible modelling of multi-species experimental disturbances. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 41, p. 125-497, 2019.
- WRIGHT, A. J. Functional traits and the growth–mortality trade-off in tropical trees. **Ecology**, v. 91, p. 3664-3674, 2010.
- ZEPPEL, M. A. B. et al. Drought and resprouting plants. **New Phytologist**, v. 206, p. 583-589, 2015.
- ZUPO, P et al. Post-fire regeneration strategies in a frequently burned Cerrado Community. **Journal of Vegetation Science**, v. 32, p. 1-27, 2020.

CAPÍTULO I

TRAÇOS MORFOFUNCIONAIS EM ESPÉCIES DE *VELLOZIA* SOB FOGO E SECA

RESUMO

Os traços funcionais auxiliam na compreensão da sobrevivência e da resposta das plantas a distúrbios como a seca e o fogo, sendo importantes na estruturação e funcionamento da vegetação, como a do campo rupestre, onde espécies de Velloziaceae tolerantes ao estresse são dominantes. Nosso objetivo foi avaliar os traços funcionais de seis espécies de *Vellozia* sob influência de fogo recorrente no ambiente contínuo e sob seca sazonal no afloramento rochoso. Adicionalmente, avaliou-se a capacidade regenerativa de *Vellozia pyrantha* e *Vellozia seubertiana* atingidas por incêndios. Foram mensuradas a altura, diâmetro da roseta, área foliar e profundidade da gema em 10 indivíduos de seis espécies de *Vellozia*, além da regeneração e rebrota em 10 indivíduos de *V. seubertiana* e 10 de *V. pyrantha* queimados. A análise de componentes principais (PCA) evidenciou agrupamento das espécies de afloramento rochoso e proximidade entre espécies de ambiente contínuo com maior valor de altura no CP1 e dos traços diâmetro da roseta e área foliar no CP2. A profundidade da gema ($p < 0,05$) foi maior em plantas de ambiente contínuo. *V. seubertiana* teve maior número de rebrotas e rosetas regeneradas após o incêndio. Nossos resultados indicam elevada capacidade de proteção dos tecidos internos em indivíduos de ambiente contínuo e provável sensibilidade das três espécies de afloramento rochoso ao fogo, sugerindo *tradeoff* entre seca e fogo. *V. pyrantha* e *V. seubertiana* são altamente resilientes à passagem do fogo. *V. seubertiana* tem rebrota epicormica, o que influencia positivamente o potencial de produção fotossintética, devido a maior área com brotações laterais.

Palavras-chaves: Campo Rupestre. Estresse tolerância. Rebrota. Velloziaceae.

ABSTRACT

Functional traits help in understanding the survival and response of plants to disturbances such as drought and fire, being important in the structuring and functioning of vegetation, such as the campo rupestre, where stress-tolerant species of Velloziaceae are dominant. Our objective was to evaluate the functional traits of six species of *Vellozia* under the influence of recurrent fire in the continuous environment and under seasonal drought in the rocky outcrop. Additionally, we evaluated the regenerative capacity of *Vellozia pyrantha* and *Vellozia seubertiana* affected by fires. Height, rosette diameter, leaf area and bud depth were measured in 10 individuals of six species of *Vellozia*. In addition to regeneration and regrowth in 10 individuals of *V. seubertiana* and 10 of *V. pyrantha* burned. Principal component analysis (PCA) showed clustering of rocky outcrop species and proximity between species of continuous environment with higher height values in CP1 and the traits rosette diameter and leaf area in CP2. The bud depth ($p < 0.05$) was higher in plants with continuous environment. *V. seubertiana* had the highest number of sprouts and rosettes regenerated after the fire. Our results indicate a high capacity for protection of internal tissues in individuals with a continuous environment and probable sensitivity of the three rocky outcrop species to fire, suggesting a *tradeoff* between drought and fire. *V. pyrantha* and *V. seubertiana* are highly resilient to the passage of fire. *V. seubertiana* has epicormic regrowth, which positively influences the photosynthetic production potential, due to the larger area with lateral shoots.

Keywords: Rupestre Field. Stress tolerant. Regrowth. Velloziaceae.

1.1 INTRODUÇÃO

Os traços funcionais são características morfológicas, fisiológicas ou fenológicas medidas a nível de indivíduo englobando da célula ao organismo, os quais estão relacionados ao crescimento, reprodução e sobrevivência do vegetal (MCGILL, 2006; VIOLLE et al., 2007), e sua análise possibilita compreensão da formação de comunidade e demais níveis de organização da vegetação (VIOLLE et al. 2007; LOIOLA et al., 2010). Além disso, estudos com essa abordagem são indispensáveis para ampliar o conhecimento sobre gestão de recursos e mecanismos de resistência das plantas aos distúrbios naturais (LAVOREL; GARNIER, 2002; HEILMEIER et al., 2019).

O fogo e a seca estão entre fatores ambientais que influenciam na distribuição, abundância e seleção de características nos vegetais (BOND; KEANE, 2017; LAMONT et al., 2019). A altura da planta, área foliar e capacidade fotossintética são traços comumente mensurados em estudos sobre funcionamento dos ecossistemas associados ao fogo e a seca, enquanto a maior espessura da casca e folhas dispostas em roseta são características relacionadas a ambiente propenso ao fogo, ambas ligadas ao isolamento e proteção da gema (COUTINHO, 1990; NEVES; CONCEIÇÃO, 2010; BOND; KEANE, 2017; DIOS, 2020).

Outro traço funcional importante que é influenciado pelo fogo e a seca é a capacidade de regeneração por meio da rebrota, característica chave para persistência do vegetal e formação de biomas resilientes (CLARKE et al., 2013; ZEPPEL et al., 2015), que é correlacionada com a dinâmica da vegetação, balanço de carbono e risco de extinção (CLARKE et al., 2010), sendo determinada pelo alinhamento entre o desenvolvimento do vegetal, banco de gemas viáveis e sua proteção (CLARKE et al., 2013). Essa forma de regeneração é considerada dispendiosa para o vegetal justamente pela necessidade de desenvolver e proteger um banco de gemas (DIOS, 2020), além da demanda de suporte nutricional via carboidratos que podem ser acumulados em estruturas radiculares e nos demais órgãos vegetais, duas formas de armazenamento comuns em espécies de campo rupestre (OLIVEIRA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016; JOAQUIM et al., 2018; DIOS, 2020).

O campo rupestre é classificado como um dos biomas mais diversos do mundo em riqueza biológica (SILVEIRA et al., 2016), onde a família Velloziaceae é dominante e representada majoritariamente por espécies do gênero *Vellozia* (ALCANTARA et al., 2015; CONCEIÇÃO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016). Nesse ecossistema, a heterogeneidade de habitat juntamente com a riqueza do gênero *Vellozia*, possibilitam cenário propício ao estudo

de plantas tolerantes ao estresse, com espécies circunvizinhas sob ação de seca sazonal nos afloramentos rochosos e de fogo recorrente na vegetação contínua (CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; NEVES; CONCEIÇÃO, 2010; CONCEIÇÃO et al., 2016).

No afloramento rochoso há predomínio de espécies tolerantes à dessecação, como *Vellozia jolyi* L.B.Sm, *Vellozia punctulata* Seub e *Vellozia hemisphaerica* Seub (CONCEIÇÃO et al., 2007; NEVES, 2009; MELLO-SILVA, 2015), enquanto no ambiente contínuo ocorre dominância de plantas graminóides e arbustos com rosetas apicais, como *Vellozia seubertiana* Goethart & Henrard (NEVES, 2009; CONCEIÇÃO et al., 2016) e a dominante, *Vellozia pyrantha* A.A.Conc. que depende do fogo para sua reprodução (CONCEIÇÃO, 2018). Outra espécie de Velloziaceae suscetível ao fogo é *Vellozia sincorana* L.B.Sm & Ayensu, encontrada nas margens rochosas de rios, encostas rochosas de morros e em pequenas elevações nos campos rupestres (CONCEIÇÃO, 2018).

Tendo em vista que os distúrbios atuam como filtros ambientais que favorecem a sobrevivência e reprodução de indivíduos com expressão de traços vantajosos, enquanto eliminam traços ineficazes (KEDDY, 1992), hipotetizamos que o fogo tem impacto marcante nos traços funcionais de *V. pyrantha*, *V. seubertiana* e *V. sincorana* encontradas em ambiente contínuo suscetível a incêndios, e a seca sazonal nos traços funcionais de *V. punctulata*, *V. jolyi* e *V. hemisphaerica* distribuídas em afloramentos rochosos. Consideramos que esses estresses abióticos podem direcionar as espécies em caminhos adaptativos opostos, impossibilitando a sobrevivência de uma mesma espécie em ambos os ambientes (DIOS, 2020). Desse modo, objetivamos avaliar a influência de fogo e seca nos traços funcionais de seis espécies de *Vellozia* encontradas em ambiente contínuo (fogo recorrente) e no afloramento rochoso não propenso a queimar e sob influência de secas frequentes, além de avaliar a capacidade reprodutiva e regeneração de *V. pyrantha* e *V. seubertiana* após serem atingidas por incêndio.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em áreas de campo rupestre no Parque Municipal de Mucugê (PMM), Mucugê, BA (Figura 1 A) e no Parque Nacional da Chapada Diamantina (PNCD), Serra do Candombá, Vale do Capão, Palmeiras, BA (Figura 1 B). O PNCD contempla uma área de 152.400 ha. Na região que o PNCD está inserido o clima é tropical semiúmido, precipitação anual de 900 mm, variação média de temperatura de 15° C a 26° C com alternância de estações chuvosa de novembro a maio e secas prolongadas, além de incêndios recorrentes geralmente no período de agosto a março, que pode ser intensificado pela seca e ventos forte (MMA, 2007).

Esses incêndios, originados principalmente pela ação humana também atingem o PMM (MMA, 2007; TV BAHIA, 2020), o qual se estende por 450 ha e está localizado em Mucugê (AZEVEDO; BERG, 2007), uma cidade com precipitação em torno de 1100 mm por ano (CERQUEIRA et al., 2008) e local de interesse social, econômico, ecoturístico e ambiental. A rica biodiversidade é objeto de pesquisas locais, como as desenvolvidas com *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R. Parra & Giul, que levaram a implantação do projeto Sempre Viva no PMM, o qual fornece apoio no desenvolvimento desses estudos, promove educação ambiental e gerencia a visitação da unidade de conservação (SANTOS et al., 2017).

1.2.2 Coleta

Os indivíduos foram marcados para realização das medidas e coleta das folhas no PNCD e no PMM, em diferentes pontos: *V. seubertiana* S 12° 59.858" W 41° 20.558", *V. sincorana* S 12° 59.520" W 41° 24.271", *V. punctulata* S 12° 59.56" W 41° 20.242", *V. jolyi* S 12° 59.466" W 41° 20.242" e *V. hemisphaerica* S 12° 0.997 W 041° 0.3484; Serra do Candombá no Vale do Capão, Palmeiras, BA: *V. pyrantha* S 12° 37. 560" W 41° 30. 468" e *V. seubertiana* S 12° 37. 931" W 41° 30.533".

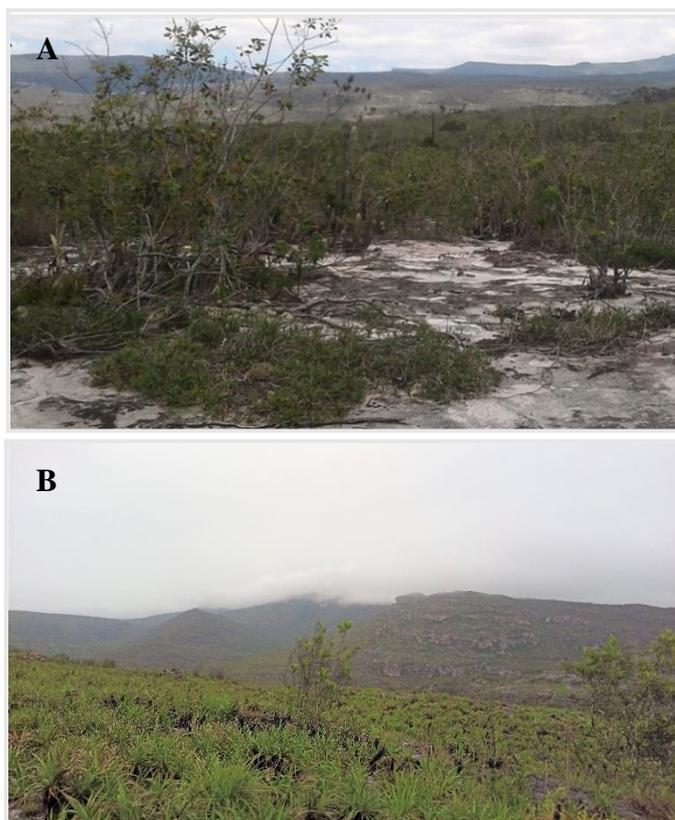


Figura 1 – Vegetação em afloramento rochoso no Parque Municipal de Mucugê, (A), Bahia, Brasil. Vegetação contínua na Serra do Candombá no Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia (B). Fotos BPS BORGES.

1.2.3 Traços morfofuncionais de seis espécies de *Vellozia* sob seca e fogo

Os dados foram mensurados em 10 indivíduos de *V. pyrantha*, *V. seubertiana*, *V. sincorana*, *V. punctulata*, *V. jolyi* e *V. hemisphaerica* marcados para medidas de parâmetros indicadores de resistência ao fogo e seca como: 1) altura do indivíduo (AL), 2) diâmetro da roseta (DR), 3) área foliar (AF) e 4) profundidade da gema na roseta (PG) (PÉREZ-HARGUINDEGUY et al., 2013). A altura da planta tem sido relacionada a sua capacidade de competitividade, reprodução e estratégia de proteção de distúrbios como o fogo e seca (PÉREZ-HARGUINDEGUY et al., 2016). A espessura da roseta está relacionada a potencialidade de isolamento dos meristemas e o menor tamanho de AF associado a estresse hídrico, alta temperatura e condições nutricionais (PÉREZ-HARGUINDEGUY et al., 2013, 2016). Já a proteção do meristema (gema) é um dos fatores relacionados ao restabelecimento vegetal em ambiente sob ação de fogo (CLARKE et al., 2013).

A sobrevivência e rebrota das plantas em estudo foram observadas após 50 dias (25/11/2020) de incêndio acidental em Mucugê, Bahia no dia 06 de outubro de 2020 em 10

plantas de *V. seubertiana*, (resistente ao fogo), *V. punctulata*, *V. jolyi* e *V. hemisphaerica* (tolerantes a dessecação) previamente marcadas.

1.2.4 Influência do fogo na capacidade reprodutiva e regeneração de duas espécies de *Vellozia*

Indivíduos das espécies *V. pyrantha* e *V. seubertiana* foram marcados em área da Serra do Candombá (PNCD) recém impactada por incêndio ocorrido no dia 15 de novembro de 2018, nos quais foram quantificados o número de rosetas regeneradas (NRR) e número de rosetas novas (NRN).

A coleta dos dados foi realizada após 2 meses de passagem do fogo em indivíduos sem ligação visível com outras plantas da mesma espécie e foram consideradas como rosetas regeneradas os ramos desenvolvidos de estrutura pré-existente e as rosetas novas como rebrota oriundas de gemas protegidas (Figura 2). Essa capacidade de rebrota tem sido relacionada diretamente a persistência das plantas no ambiente, sendo considerada um traço funcional chave em ambiente com distúrbios como o fogo (CLARKE et al., 2013).



Figura 2 - *Vellozia seubertiana* após incêndio acidental no Parque Municipal de Mucugê - Projeto Sempre Viva em Mucugê, Bahia. Setas indicam as rosetas regeneradas e novas (rebrota). Foto BPS BORGES.

1.2.5 Mensuração dos parâmetros

As medidas de AL, DR e PG foram realizadas utilizando trena, fita métrica e paquímetro. A AL foi medida do solo até a folha mais alta, o DR medido a 4 cm abaixo da primeira folha para as espécies de ambiente contínuo e 2 cm para as espécies de afloramento rochoso devido ao menor comprimento dos ramos. A avaliação de AF foi realizada com três folhas retirada da parte mediana da planta, as quais foram envolvidas em papel alumínio, acondicionadas em saco plástico com fecho hermético e colocadas em caixa térmica de isopor com gelo para conservação até a chegada no local de realização das mensurações. A mensuração da AF foi realizada utilizando aparelho medidor de área foliar (Li-Cor, modelo Li-3100C). A parte subterrânea de dois indivíduos de cada espécie foi exposta apenas para adquirir informação adicional sobre a presença de estrutura relacionada a reserva de carboidrato.

A PG foi avaliada em cinco indivíduos de cada espécie, nos quais foram realizados cortes verticais na parte central do pseudocaule para visualização e mensuração da gema (Figura 3 A e B). Na espécie *V. jolyi* foi necessário coletar plantas não marcadas para a medida de PG, pois todos os indivíduos identificados morreram após a ocorrência de incêndio acidental em Mucugê, Bahia.

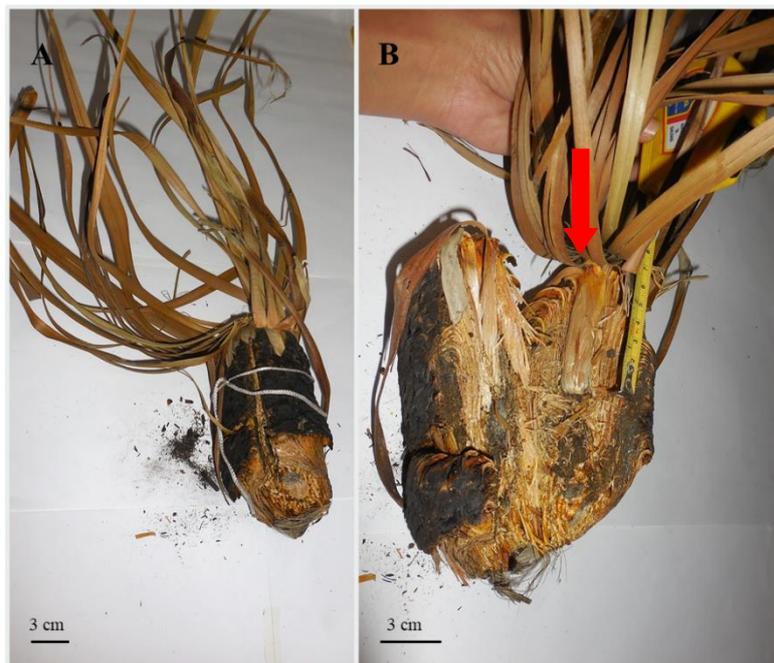


Figura 3 – Pseudocaule de *Vellozia pyrantha*. Corte na região central (A), Gema exposta (B). Fotos BPS BORGES. A seta indica a gema.

1.2.6 Análises estatísticas

A mensuração de altura foi avaliada com as medidas de 10 indivíduos para cada espécie (10 indivíduos x 6 espécies), já para AF foram obtidas médias a partir de três folhas por planta (3 folhas x 10 indivíduo x 6 espécies). As médias de DR foram calculadas de seis rosetas por indivíduo (6 rosetas x 10 indivíduos x 6 espécies), enquanto a PG foi avaliada em 5 indivíduos, 1 roseta por planta (5 indivíduos x 6 espécies). O DR de *V. pyrantha*, *V. seubertiana* e *V. hemisphaerica* foi obtido utilizando a fórmula $C = d \cdot \pi$, onde, C corresponde ao comprimento da circunferência e d ao diâmetro.

O NRR e NRN de *V. pyrantha* e *V. seubertiana* foram analisadas a partir da contagem de rosetas regeneradas e novas em 10 indivíduos por espécie (10 indivíduos x 2 espécies).

Os dados foram submetidos a verificação de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, utilizando o programa R Core Team, v 4.0.5 (2020). A relação entre as seis espécies de *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo recorrente) e afloramento rochoso (seca) foi verificada através da análise multivariada de componentes principais (PCA), utilizando o programa PAST, v. 4.03, desenvolvido por Hammer et al. (2001). A média dos traços funcionais diâmetro da roseta, área foliar e o valor obtido de cada planta para altura do indivíduo foram transformados para a realização de PCA por meio da fórmula $z = \text{escore bruto} - \text{média} / \text{desvio padrão}$.

Os dados de PG, assim como os de NRR e NRN em *V. pyrantha* e *V. seubertiana* foram analisados usando as medianas dos tratamentos com o teste Kruskal-Wallis e comparadas pelo teste Dunn`pos hot, com o programa PAST, v. 4.03 (Hammer et al. 2001).

A análise dos parâmetros DR, AF, AL entre as espécies, foi realizada utilizando o teste de Tukey no programa SISVAR, v 5.3, desenvolvido por Ferreira (2011) com as médias de DR transformadas por $y + 1.0 - \sqrt{y + 1.0}$.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Traços morfofuncionais de seis espécies de *Vellozia* sob seca e fogo

Na análise de componentes principais (PCA) os dois primeiros componentes explicaram 92 % da variância dos dados, dos quais 70 % correspondem ao CP1 e 22 % ao CP2 (Tabela 1 Anexo A). No componente principal 1 os valores mais representativos foram dos traços funcionais AF e DR, enquanto no 2 predominou o parâmetro AL (Tabela 1 Anexo A).

A ordenação obtida pela análise de PCA indica *tradeoff* entre fogo e seca diante do agrupamento das três espécies de *Vellozia* relacionadas ao afloramento rochoso, e maior proximidade entre as espécies relacionadas a ambiente contínuo (Figura 4). *V. punctulata*, *V. jolyi* e *V. hemisphaerica* se sobrepõem no gráfico devido à similaridade em menor altura, enquanto *V. seubertiana* e *V. sincorana* estão mais próximas em relação ao maior comprimento, já *V. pyrantha* se distancia um pouco de ambas com maiores valores de AF e DR (Figura 4).

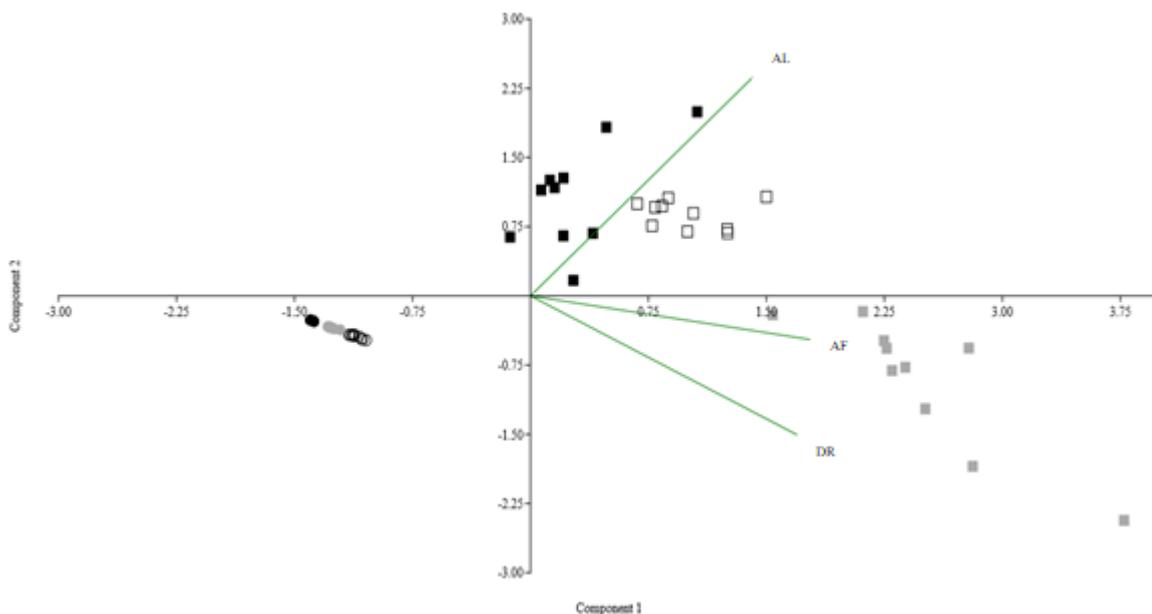


Figura 4 – Ordenação gerada pela análise de componentes principais (PCA) utilizando a altura do indivíduo (AL), diâmetro das rosetas (DR) e área foliar (AF) de três espécies do gênero *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo). ■ - *Vellozia sincorana*, □ - *Vellozia seubertiana*, ■ - *Vellozia pyrantha* e três espécies de afloramento rochoso (seca) ● - *Vellozia jolyi*, ○ - *Vellozia hemisphaerica* e ● - *Vellozia punctulata*.

A PG diferiu ($p < 0,05$) entre espécies de ambiente contínuo e afloramento rochoso (Tabela 2 e 3 Apêndice A), apresentando maior valor em plantas no ambiente relacionado ao fogo e o menor onde a seca predomina (Figura 5 e 6).

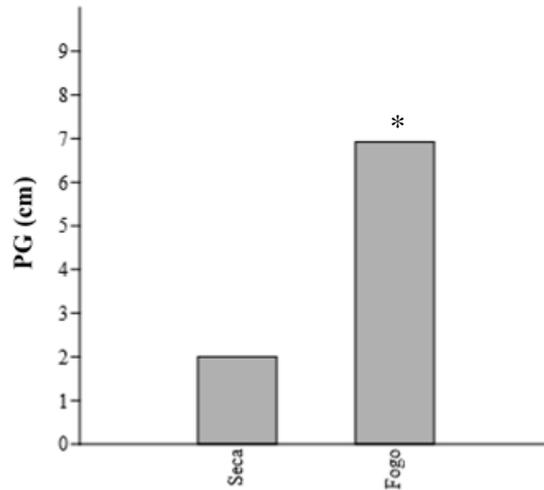


Figura 5 – Profundidade da gema (PG) de seis espécies do gênero *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo) (*Vellozia seubertiana*, *Vellozia sincorana* e *Vellozia pyrantha*) e afloramento rochoso (seca) (*Vellozia punctulata*, *Vellozia jolyi* e *Vellozia hemisphaerica*). * Significativo pelo teste de Dunn a 5% de probabilidade.



Figura 6 – Profundidade da gema foliar de seis espécies do gênero *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo) *Vellozia sincorana* (A), *Vellozia seubertiana* (B), *Vellozia pyrantha* (C), e de afloramento rochoso (seca) *Vellozia jolyi* (D), *Vellozia punctulata* (E) e *Vellozia hemisphaerica* (F). Barra referente a 1 cm. A seta indica a gema. Fotos BPS BORGES.

Na comparação das características entre as espécies a análise de variância ($p < 0,01$) indicou diferença nos parâmetros AL, DR e AF (Tabela 4 Apêndice A).

A AL foi maior para *V. seubertiana* e *V. sincorana*, enquanto o DR foi maior para *V. pyrantha* (Figura 7 A e B). A maior AF foi observada para *V. pyrantha* e as menores para *V. hemisphaerica*, *V. punctulata*, *V. jolyi* e *V. sincorana* (Figura 7 C).

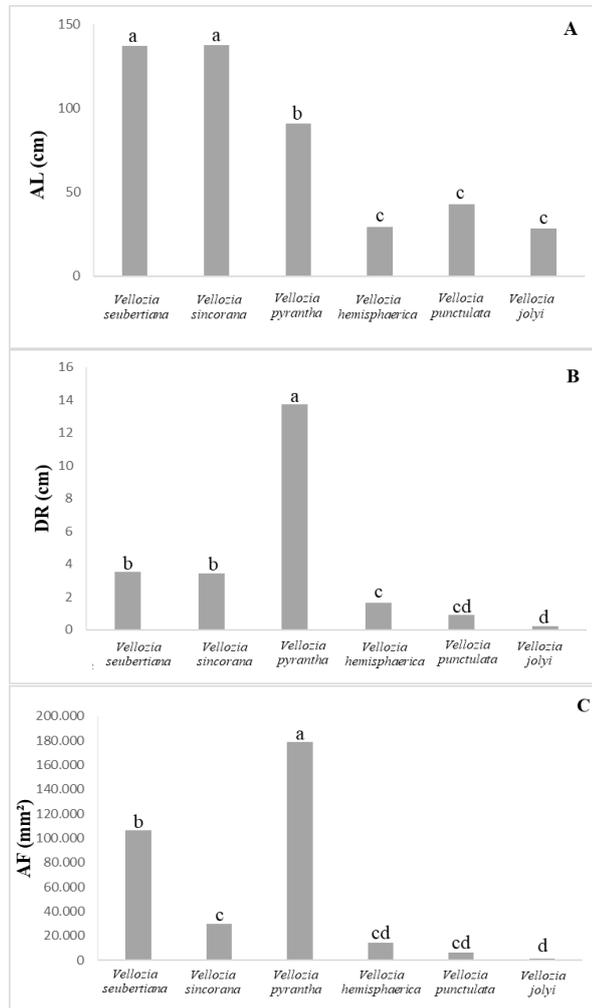


Figura 7 – Altura do indivíduo (AL), diâmetro da roseta (DR) e área foliar (AF) de seis espécies do gênero *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo) e afloramento rochoso (seca). Médias com a mesma letra não diferem entre pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O teste de Kruskal-Wallis e a comparação pelo teste Dunn` ($p < 0,05$) entre as espécies mostrou diferença na PG (Tabela 5 e 6 Apêndice A). A gema mais profunda na roseta foi visualizada em *V. seubertiana*, enquanto as mais superficiais foram observadas em *V. hemisphaerica*, *V. punctulata* e *V. jolyi* (Figura 8).

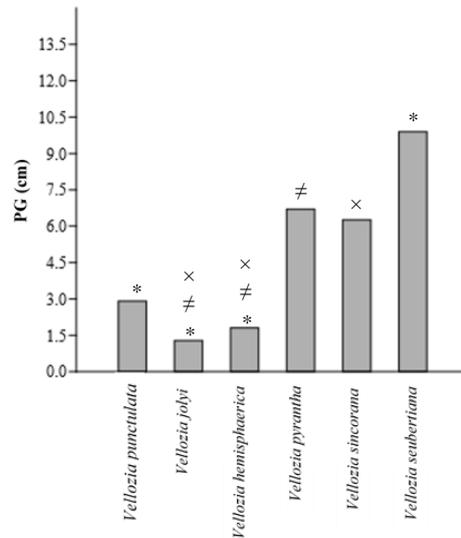


Figura 8 - Profundidade da gema (PG) de seis espécies do gênero *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo) e afloramento rochoso (seca). Teste de Dunn a 5% de probabilidade. * Diferença entre *Vellozia seubertiana* - *Vellozia punctulata*, *Vellozia jolyi* e *Vellozia hemisphaerica*. × Diferença entre *Vellozia sincorana* - *Vellozia jolyi* e *Vellozia hemisphaerica*. ≠ Diferença entre *Vellozia pyrantha* - *Vellozia jolyi* e *Vellozia hemisphaerica*.

Após 50 dias da passagem do fogo em Mucugê foi constatado a morte dos 10 indivíduos de *V. jolyi* e 4 plantas de *V. punctulata*, correspondendo a 100 % e 40 % respectivamente (Figura 9). A *V. seubertiana* rebrotou após o incêndio e não houve nenhuma morte para essa espécie (Figura 10). O incêndio não atingiu indivíduos de *V. hemisphaerica*, os quais permaneceram vivos. A *V. sincorana* também não foi atingida pelo incêndio.



Figura 9 – Área atingida pelo fogo com indivíduos mortos de *Vellozia punctulata* (A e B) e *Vellozi jolyi* (C e D) após incêndio acidental no Parque Municipal de Mucugê, Mucugê, BA. Seta azul – indivíduos mortos e seta vermelha – Plantas circunvizinha vivas. Fotos BPS BORGES.

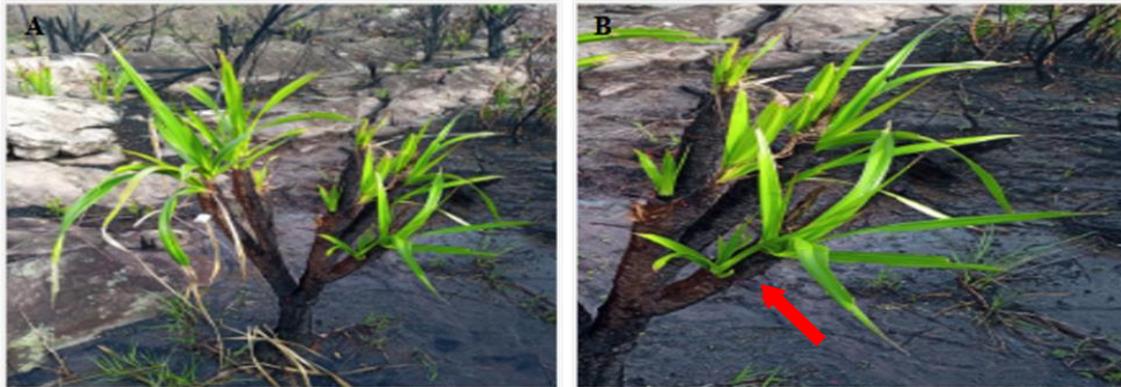


Figura 10 – Rebrotas de *Vellozia seubertiana* (A) e detalhe de brotos laterais (B) após incêndio no Parque Municipal de Mucugê, Mucugê, BA. Seta vermelha indica brotos. Fotos BPS BORGES.

Não foi observado órgão espesso de reserva nutricional em nenhuma das seis espécies de *Vellozia* (Figura 11 e 12).



Figura 11 – Estrutura radicular de três espécies do gênero *Vellozia* de afloramento rochoso (seca) *Vellozia punctulata* (A e B), *Vellozia hemisphaerica* (C e D) e *Vellozia jolyi* (E e F). Parque Municipal de Mucugê, Bahia (Projeto Sempre Viva). Fotos BPS BORGES.



Figura 12 – Estrutura radicular de três espécies de *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo) *Vellozia sincorana* (A e B), *Vellozia pyrantha* (C e D) e *Vellozia seubertiana* (E e F). Parque Municipal de Mucugê (Projeto Sempre Viva) e Parque Nacional da Chapada Diamantina. Fotos BPS BORGES (A, B, E e F) e AA CONCEIÇÃO (C e D).

1.3.2 Influência do fogo na capacidade reprodutiva e regeneração de duas espécies de *Vellozia*

O número de rosetas novas (NRN) diferiu ($p < 0,01$) entre *V. seubertiana* e *V. pyrantha* após dois meses de contato com o fogo (Tabela 7 e 8 Apêndice A). *V. seubertiana* apresentou maior número de NRN (Figura 13). *V. pyrantha* apresentou predomínio de rebrota apical e *V. seubertiana* epicórmica.

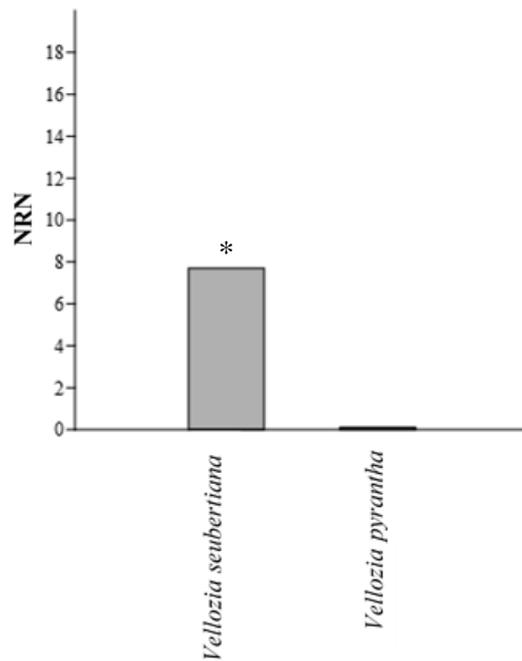


Figura 13 – Número de rosetas novas (NRN) de duas espécies do gênero *Vellozia* após dois meses de incêndio no campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. *Significativo pelo teste de Dunn a 5% de probabilidade.

1.4 DISCUSSÃO

A tendência de agrupamento dos indivíduos indica *tradeoff* entre espécies de vegetação contínua e afloramento rochoso, ou seja, caminho adaptativo oposto com alta especialização ao fogo ou a seca, o que reforça a influência desses filtros ambientais no habitat. O *tradeoff* influencia a dinâmica de coexistência entre espécies formando nichos pelo direcionamento na captação e alocação de recursos com diferença entre as espécies na capacidade de tolerância e crescimento (ANGERT et al., 2009), como foi possível observar nos dois ambientes delineados pela ação de perturbações abióticas citadas acima (CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; OLIVEIRA et al., 2016).

Esse *tradeoff* pode ser observado na análise de componentes principais com a formação de grupo coeso das espécies de afloramento rochoso e convergência dos traços para redução de perda hídrica devido à seca sazonal, enquanto as espécies de ambiente contínuo se aproximam pela propensão a maior produtividade fotossintética e eficiência de proteção ao fogo. Uma relação de *tradeoff* similar foi observada por Dios et al. (2018) avaliando os traços espessura da casca (fogo) e embolia (seca) em espécies de coníferas, nas quais não constataram o investimento de carbono simultâneo para tolerância ao fogo e resistência a embolia.

Nos componentes principais 1 e 2 a disposição dos indivíduos relacionada à altura mostra delimitação arquitetônica das espécies tolerantes a dessecação de afloramento rochoso, que pode ser ligada a restrição hídrica imposta pelo habitat rupícola e a necessidade de restabelecimento hídrico após a dessecação extrema exercido por mecanismos como a pressão da raiz e ação capilar da água ao longo do xilema (SCHNEIDER et al., 2000; ALPERT, 2006), em contraste ao maior comprimento das espécies de ambiente contínuo (fogo) onde a disponibilidade hídrica é maior.

As maiores alturas e diâmetros das rosetas dispostas no componente principal 1 contrastantes com a distribuição das espécies de afloramento rochoso são estratégias chaves relacionada a ambiente de savana, onde o fogo é fator ambiental recorrente (DANTAS; PAUSAS, 2013). O escape consiste no distanciamento do meristema apical da ação direta do fogo proporcionado pelo maior comprimento da planta, possibilitando maior chance de sobrevivência das espécies (BOND, 2008), em contrapartida o diâmetro da roseta formada pela fusão de bainhas foliares persistentes e raízes adventícias tende a favorecer a proteção

dos tecidos meristemáticos (gemas), que são determinantes para a resiliência e a emissão de propágulos das espécies (RAPINI et al., 2008; CLARKE et al., 2013).

O diâmetro da roseta combinado com a maior PG das espécies de ambiente contínuo tende a aumentar a capacidade de persistir nesse ambiente de fogo recorrente. Além disso, a diferença de profundidade da gema entre as espécies de ambiente contínuo e afloramento rochoso evidencia a influência da pressão de seleção nesses locais (fogo ou seca), pois plantas de ambiente com fogo recorrente tende a apresentar gemas mais profundas, que indivíduos onde o fogo não é comum como observado em árvores e várias espécies na savana africana sob e sem ação do fogo (CHARLES-DOMINIQUE et al., 2015).

As maiores AF dos indivíduos de ambiente contínuo representam elevado potencial fotossintético, pois captação luminosa é fator chave para produção vegetal (KERBAUY, 2019), o que indica tendência de maior produtividade quando comparada as espécies de afloramento rochoso com menores áreas foliares. Esse contraste na AF das espécies pode ser relacionado ainda a influência na disponibilidade de retenção hídrica (LUTTGE et al., 2007), considerando a restrição de água do afloramento rochoso e, portanto, tendência de maior proteção contra a perda desse solvente com a redução da área de evaporação.

Os resultados de AL, DR, AF e PG entre as espécies reforçam o padrão que culmina em maior proteção a seca ou ao fogo. Nas espécies de ambiente contínuo notou-se apenas diferentes estratégias relacionadas a passagem do fogo, pois enquanto foi constatado maior DR e AF em *V. pyrantha*, as espécies *V. seubertiana* e *V. sincorana* investiram mais em altura. Em relação as características entre espécies de afloramento rochoso destacam-se as médias menores dos parâmetros supracitados formando um grupo em função das condições de escassez hídrica.

Os caminhos adaptativos opostos dos traços funcionais foram observados claramente com a morte de todos os indivíduos de *V. jolyi* e alguns de *V. punctulata* (afloramento rochoso) afetados pelo fogo, contrastando com a regeneração e rebrota em *V. seubertiana* (vegetação contínua) cinquenta dias após incêndio acidental em Mucugê, BA. A sensibilidade das espécies de afloramento rochoso também foi observada após outros incêndios nesse ambiente, que provocaram mortalidade de indivíduos de *V. punctulata* e *V. hemisphaerica* (NEVES; CONCEIÇÃO, 2010; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2016).

A ausência de estrutura visível de reserva nutricional nas espécies de *Vellozia* em estudo sugere utilização de vias bioquímicas para o restabelecimento das plantas após distúrbios de seca e fogo. Em uma dessas vias, os carboidratos não-estruturais como amido e

frutanos, normalmente ligados a osmorregulação em espécies de campo rupestre, podem ser redirecionados para a manutenção da resiliência dos vegetais a esses estresses abióticos (CLARKE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

1.4.1 Influência da passagem do fogo na capacidade reprodutiva de duas espécies de *Vellozia*

O NRN das duas espécies de *Vellozia* está relacionada a persistência no ambiente contínuo com predomínio de ativação de gemas axilares em *V. seubertiana*, que proporciona impacto na arquitetura do indivíduo devido a influência na área de absorção de luz (produtividade) e provavelmente na reprodução sexuada, afinal cada roseta tem potencial para sustentar flores isoladas (NEVES, 2009), enquanto a menor porcentagem de rebrota em *V. pyrantha* pode está ligada a dependência do fogo para a reprodução sexuada, pois a emissão de maior quantidade de brotos atuaria como dreno dos recursos, disputando com a floração e produção de sementes (KERBAUY, 2019). Além disso, nessa espécie prevalece a rebrota apical e plantas com esse tipo de emissão de brotos, geralmente sobrevivem ao fogo pela alta capacidade de proteção da gema apical e não necessariamente através da reprodução assexuada após a perturbação (CLARKE et al., 2013).

Nas duas espécies a capacidade de restabelecimento do indivíduo se destaca, diante da interessante capacidade de multiplicação das células vegetais e reconstituição foliar, ressurgindo das cinzas em coexistência com o fogo.

1.5 CONCLUSÃO

A seca e o fogo são fatores determinantes na conformação dos traços morfofuncionais e na persistência das seis espécies do gênero *Vellozia* em ambiente contínuo e em afloramento rochoso. A forte coesão entre *V. punctulata*, *V. jolyi* e *V. hemisphaerica* do ambiente sob secas sazonais e sua segregação de *V. seubertiana*, *V. pyrantha* e *V. sincorana* propícias a queimar são evidências da existência de *tradeoff* entre indivíduos de ambiente contínuo e afloramento rochoso, ou seja, adaptação a seca ou ao regime de fogo.

V. seubertiana tem alta capacidade de regeneração e resiliência através de rebrota epicórmica e proteção do banco de gemas aéreas favorecida pela profundidade na roseta, assim como *V. pyrantha* é eficiente no isolamento térmico dos tecidos meristemáticos combinando maior diâmetro e gemas localizadas mais internamente na roseta.

1.6 REFERÊNCIAS

ALPERT, P. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 1575-1584, 2006.

ALCANTARA, S. et al. Carbon assimilation and habitat segregation in resurrection plants: a comparison between desiccation and non-desiccation-tolerant species of Neotropical Velloziaceae (Pandanales). **Functional Ecology**, British Ecological Society, v. 29, p. 1499-1512, 2015.

ANGERT, A. L. et al. Functional tradeoffs determine species coexistence via the storage effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 106, p. 11641-11645, 2009.

AZEVEDO, C. O.; BERG, C. V. D. The orchidaceae of “Parque Municipal de Mucugê”, Bahia, Brazil. **Lankesteriana International Journal on Orchidology**, Costa Rica, v. 7, p. 443-445, 2007.

BOND, W. J.; KEANE, R. E. Fires, Ecological Effects of. Reference Module in Life Sciences. **Scientific Journal**, p. 435-442, 2017.

BOND, W. What Limits Trees in C4 Grasslands and Savannas? **Annual Review of Ecology Evolution, and Systematics**, v. 39, p. 641-59, 2008.

CERQUEIRA, C. O.; FUNCH, L. S.; BORBA, E. L. Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. Subsp. *Mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 22, p. 962-969, 2008.

COUTINHO, L. M. Fire in the Ecology of the Brazilian Cerrado. In: GOLDAMMER J. G. (eds). **Fire in the Tropical Biota**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1990. p. 82-105.

CONCEIÇÃO, A. A. A hot case for conservation: Candomba (*Vellozia pyrantha*), a flammable plant endemic to a national park is used to make a fire and threatened by fire suppression policy. **Journal for Nature Conservation**, v. 45, p. 118-121, 2018.

CONCEIÇÃO, A. A.; RAPINI, A.; CARMO F. F.; BRITO, J. C.; SILVA, G. A.; NEVES, S. P. S.; JACOBI, C. M. Rupestrian Grassland Vegetation, Diversity, and Origin. In: FERNANDES, G. W. **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**, 2016. p. 105-127.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica**, v. 23, p. 85-111, 2005.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R.; MEIRELLES, S. T. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of “Chapada Diamantina”, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 641-656, 2007.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Succession on the Rocky Outcrop Vegetation: A Rupestrian Grassland Scheme. In: FERNANDES, G. W. **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**, 2016. p. 181-206.

- CHARLES-DOMINIQUE, T et al. Bud protection: a key trait for species sorting in a forest–savana mosaic. **New Phytologist**, v. 207, p.1052-1060, 2015.
- CLARKE, P. J. et al. Resprouting as a key functional trait: how buds, protection and resources drive persistence after Fire. **New Phytologist**, v. 197, p. 19-35, 2013.
- DANTAS, V. L.; PAUSAS, J. G. The lanky and the corky: fire-escape strategies in savana woodt species. **Journal of Ecology**, v. 101, p. 1265-1272, 2013.
- DIOS, V. R. Effects of Fire on Plant Performance. In: _____ **Plant-Fire Interactions Applying Ecophysiology to Wildfire Management**. Springer Nature Switzerland, 2020. p. 117-175.
- DIOS, V. R. A *trade-off* between embolism resistance and bark thickness in conifers: are drought and fire adaptations antagonistic? **Plant Ecology & Diversity**, v. 11, p. 253-258, 2018.
- FERREIRA, F. D. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- HAMMER, Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia eletrônica** v. 4, p. 1-9, 2001.
- HEILMEIER, H. Functional traits explaining plant responses to past and future climate changes. **Flora**, v. 254, p. 1-11, 2019.
- JOAQUIM, E. O. et al. Diversity of reserve carbohydrates in herbaceous species from Brazilian campo rupestre reveals similar functional traits to endure environmental stresses. **Flora**, v. 238, p. 201-209, 2018.
- KEDDY, P. A. Assembly and response rules: two goals for predictive community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 3, p. 157-164, 1992.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. 420 p.
- LAMONT, B. B.; HE, T.; YAN, Z. Evolutionary history of fire-stimulated resprouting, flowering, seed release and germination. **Biological Reviews**, v. 94, p. 903-928, 2019.
- LAVOREL, S.; GARNIER, E. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. **Functional Ecology**, v. 16, p. 545-556, 2002.
- LOIOLA, P. P. et al. Functional diversity of herbaceous species under different fire frequencies in Brazilian savanas. **Flora**, v. 205, p. 674-681, 2010.
- LUTTGE, U. et al. Physiological ecology of photosynthesis of five sympatric species of Velloziaceae in the rupestrian fields of Serra do Cipo, Minas Gerais, Brazil. **Flora**, v. 202, p. 637-646, 2007.
- MMA. Plano de manejo para o parque nacional da Chapada Diamantina, Instituto Chico Mendes. **Documento de estudo**, Brasília, 2007.
- MCGILL, B. J. et al. Rebuilding community ecology from functional traits. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 2, p. 178-185, 2006.

MELLO-SILVA, R. Velloziaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

NEVES, S. P. S. **Fenologia, biologia floral e polinização de espécies de Velloziaceae endl. em área de campo rupestre na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil**. 2009, 67p. Dissertação (Botânica) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2009.

NEVES, S. P. S.; CONCEIÇÃO, A. A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. **Acta Botânica Brasílica**, v. 24, p. 697-707, 2010.

OLIVEIRA, R. S. et al. Ecophysiology of Campos Rupestres Plants. In. FERNANDES, G. W. **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**. 2016. p. 227-272.

PÉREZ-HARGUINDEGUY, N. et al. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, v. 61, p. 167-234, 2013.

PÉREZ-HARGUINDEGUY, N. et al. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, v. 64, p. 715-716, 2016.

RAPINI, A et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, p. 15-23, 2008.

SANTOS, K. A. et al. Gestão Ambiental de Unidades de Conservação: uma Análise do Parque Municipal de Mucugê – Bahia. **Revista do Departamento de Geografia**, v. Especial, p. 29-37, 2017.

SILVEIRA F. A. O. et al. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant and Soil**, v. 403, p. 129-152, 2016.

SCHNEIDER, H. et al. Water rise kinetics in refilling xylem after desiccation in a resurrection plant. **New Phytologist**, v. 148, p. 222-238, 2000.

TV BAHIA. **Incêndio que atinge Chapada Diamantina tem indícios de crime ambiental; área estava preservada havia 20 anos**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/ba/bahia>>. Acesso em: 22.07.2022.

VIOLLE, C. et al. Let the concept of trait be functional! **Oikos**, v. 116, p. 882-892, 2007.

ZEPPEL, M. A. B. et al. Drought and resprouting plants. **New Phytologist**, v. 206, p. 583-589, 2015.

CAPÍTULO II

CRESCIMENTO INICIAL *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE *VELLOZIA* DA CHAPADA DIAMANTINA

RESUMO

Espécies do gênero *Vellozia* tem ocorrência notável nos campos rupestres, a maioria delas é endêmica do Brasil, com alto potencial ornamental e marcantes adaptações ao fogo e a dessecação. O trabalho objetivou avaliar a influência da composição do meio de cultura sobre o crescimento inicial *in vitro* de quatro espécies de *Vellozia*, sendo três endêmicas da Chapada Diamantina. O crescimento inicial de indivíduos de cada espécie foi comparado em diferentes concentrações do meio MS (MS/2; MS/3), sacarose (7,5; 15; 30 g.L⁻¹) e carvão ativado (0; 1 g.L⁻¹) via análise de variância e teste Tukey. O meio MS/3 é o mais indicado para o crescimento inicial de *Vellozia sincorana* e *Vellozia punctulata*, enquanto o mais recomendado para *Vellozia jolyi* e *Vellozia seubertiana* é o MS/2, ambos acrescidos de 15 g.L⁻¹ de sacarose. O maior investimento em raízes das espécies aqui estudadas potencializa a absorção de água e nutrientes em ambientes sob restrições hídricas e edáficas, o que é condizente com o sucesso das Velloziaceae no campo rupestre.

Palavras-chaves: Campo Rupestre. Velloziaceae. Estabelecimento *in vitro*. Meio de cultura.

ABSTRACT

Species of the genus *Vellozia* have a notable occurrence in campos rupestres, most endemic of Brazil, with high ornamental potential and remarkable adaptations to fire and/or desiccation. The aim of this work was to evaluate the influence of the composition of the culture medium on the initial *in vitro* growth of desiccation-tolerant and fire-resistant *Vellozia* species from Chapada Diamantina. For this purpose, different concentrations of MS medium (MS/2; MS/3), sucrose (7.5; 15; 30 g.L⁻¹) and activated charcoal (0; 1 g.L⁻¹) were tested. Statistical analysis was performed using the Tukey test with the Sisvar program. The results indicated the use of MS/3 medium for the initial growth of *Vellozia sincorana* and *Vellozia punctulata* and while the most recommended for *Vellozia jolyi* and *Vellozia seubertiana* is the MS/2, both added with 15 g.L⁻¹ of sucrose. The greater investment in roots of the species studied here enhances the absorption of water and nutrients in environments under water and edaphic restrictions, which is consistent with the success of Velloziaceae in the campo rupestre.

Keywords: Rupestrian field. Velloziaceae. *In vitro* establishment. Culture medium.

2.1 INTRODUÇÃO

No cultivo *in vitro* um fator básico ao crescimento da planta é a composição do meio de cultura, o qual pode conter combinações de macro e micronutrientes acrescidos de substâncias como a sacarose, utilizada na construção de esqueletos de carbono, e o carvão ativado que pode favorecer o crescimento *in vitro* de vegetais diante do seu potencial de absorção de substâncias liberadas pela planta ou presentes no ágar (GEORGE, 2008; GALDIANO JUNIOR et al., 2012).

O estudo do estabelecimento *in vitro* permite avanços na aplicação das técnicas que possibilitam selecionar plantas com características de interesse em procedimentos relativamente rápidos e espaço reduzido (ABDELALEEM et al., 2019), sendo ferramenta importante no fornecimento de material uniforme para estudos de espécies resistentes ou tolerantes aos estresses abióticos (seca e fogo) (DJILIANOV et al., 2005; ABDELALEEM et al., 2019).

Espécies tolerantes à dessecação e resistentes ao fogo são encontrados na família Velloziaceae, um grupo abundante no campo rupestre, que se destaca pela presença de fibra, resina e alto potencial ornamental (AYENSU, 1973; SILVEIRA et al., 2016). O gênero *Vellozia* concentra a maioria das suas espécies, as quais são restritas ao Brasil e a maior parte delas endêmica do campo rupestre da Cadeia do Espinhaço (ALCANTARA et al., 2018; MELLO-SILVA, 2018).

O campo rupestre é considerado um hotspot de biodiversidade, com ambiente heterogêneo e sob forte influência de fogo e seca (SILVEIRA et al., 2016; ARAÚJO; CONCEIÇÃO, 2021). Nesse cenário, há espécies tolerantes à dessecação em ilhas de vegetação nos afloramentos rochosos, como *Vellozia jolyi* L.B.Sm. e *Vellozia punctulata* Seub. (CONCEIÇÃO et al., 2007) e plantas resistentes ao fogo na vegetação contínua com maior disponibilidade de solo e sob incêndios recorrentes, como os arbustos *Vellozia seubertiana* Goethart & Henrard e *Vellozia sincorana* L.B.Sm & Ayensu (NEVES, 2009; CONCEIÇÃO et al., 2016; CONCEIÇÃO, 2018).

A seleção de genes de interesse, considerando a riqueza genética (tolerância ou resistência a estresse abiótico) e o potencial econômico de *Vellozia* são pouco explorados devido à dificuldade para manter as mudas vivas até o estágio adulto (AYENSU, 1973), sendo ainda incipiente o avanço no estudo de sua produção em larga escala no cultivo *in vitro*. Há apenas o estudo de regeneração de brotos em *Vellozia pyrantha*, que utilizou MS como meio

básico, com metade da concentração salina (MS/2) (BORGES et al., 2020). Esse meio de cultura reduzido em nutrientes tem sido indicado como ideal para micropropagação de outras espécies do campo rupestre: *Comanthera curralensis* Moldenke (ALBUQUERQUE et al., 2016), *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (OLIVEIRA et al., 2021), *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *Melocactus paucispinus* G. Heimen & R. Paul (RESENDE et al., 2021). Diante disso e devido ao solo do campo rupestre ser pobre em nutrientes (OLIVEIRA et al., 2015), espera-se que as espécies de *Vellozia* apresentem reduzida exigência nutricional para seu crescimento. Assim, o estudo visou avaliar a influência da composição do meio de cultura sob o crescimento inicial *in vitro* de *V. sincorana*, *V. seubertiana*, *V. punctulata* e *V. jolyi* endêmicas do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020), das quais três são restritas a Chapada Diamantina (*V. sincorana*, *V. punctulata* e *V. jolyi*).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Velloziaceae e campo rupestre

A família Velloziaceae apresenta ampla distribuição e dominância no campo rupestre (ALCANTARA et al., 2018), representada em sua maioria pelo gênero *Vellozia* no Brasil (MELLO-SILVA, 2018), esse grupo destaca-se pela presença de fibras, resina e pelo potencial ornamental diante da floração sincronizada e beleza de suas flores (AYENSU, 1973). O campo rupestre é considerado um hotspot local de biodiversidade e o centro de diversidade de plantas tolerantes a dessecação (ALCANTARA et al., 2015; BRUM et al., 2017), o que pode ser associado a seus fatores extremos como alta incidência solar, incêndios recorrentes e solos pobres (SILVEIRA et al., 2016). Essas condições ambientais permitem a lapidação de espécies raras como as tolerantes a dessecação *V. jolyi* e *V. punctulata* sob afloramento rochoso em ilhas de vegetação, caracterizado por alta superfície de rocha exposta de forma descontínua, e as pitorescas pirofíticas representadas por *V. seubertiana* e *V. sincorana* que ocorrem no ambiente contínuo com maior disponibilidade de solo e incêndios recorrentes (CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; CONCEIÇÃO et al., 2007; NEVES, 2009; CONCEIÇÃO, 2018), todas endêmicas do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020).

2.2.2 Coleta de sementes

As sementes foram coletadas nas áreas do campo rupestre do Parque Municipal de Mucugê, Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil, em diferentes pontos: 12°59'S 041°20'W (*V. seubertiana* Goethart & Henrard), 12°59'S 041°24'W (*V. sincorana* L.B.Sm. & Ayensu), 12°59'S 041°20'W (*V. punctulata* Seub.) e 12°59'S 041°20'W (*V. jolyi* L.B.Sm & Ayensu). Após a coleta dos frutos, as sementes foram retiradas das cápsulas e armazenadas em sacos de papel na geladeira com temperatura de 6 a 10°C, por três meses.

2.2.3 Condições de cultivo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana. As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25± 3°C e fotoperíodo de 16h com radiação fotossintética de 60 μmol m⁻² s⁻¹.

2.2.4 Desinfestação das sementes

As sementes foram lavadas com detergente e água para retirar a impureza superficial, posteriormente foram levadas para a câmara de fluxo laminar, na qual foram imersas em álcool a 70% por 1 minuto, seguida de hipoclorito NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente por 10 minutos e por fim foram lavadas três vezes com água destilada estéril (BORGES, 2015).

2.2.5 Composição de meio de cultura no crescimento inicial de *Vellozia*

As sementes (1 por tubo) foram cultivadas em diferentes concentrações do meio de cultura MS (MS/2 e MS/3) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e sacarose (7,5; 15; 30 g.L⁻¹), solidificados com 7,0 g.L⁻¹ de ágar com pH ajustado para 5,7 ±1 e autoclavada à temperatura de 121°C por 15 minutos (Tabela 2). A presença e ausência de carvão ativado (0,0; 1,0 g.L⁻¹) foi testada apenas nos experimentos de *V. seubertiana* e *V. sincorana*, pois nas demais espécies houve resultados negativos em ensaios preliminares com essa substância. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com arranjo fatorial de duas concentrações de meios x três concentrações de sacarose. Nos experimentos de *V. seubertiana* e *V. sincorana*, o delineamento foi combinado com duas concentrações de carvão ativado (Tabela 1). Todos os tratamentos foram compostos por 6 repetições com 5 tubos e apenas para *V. sincorana* 4 repetições contendo 4 tubos cada, devido a quantidade reduzida de sementes disponíveis.

Tabela 1 – Composição dos tratamentos para o experimento de *Vellozia seubertiana* e *Vellozia sincorana*.

Tratamentos	Sacarose	Concentração de meio	Carvão ativado
T1	7,5	MS/2	0,0
T2	7,5	MS/2	1,0
T3	7,5	MS/3	0,0
T4	7,5	MS/3	1,0
T5	15	MS/2	0,0
T6	15	MS/2	1,0
T7	15	MS/3	0,0
T8	15	MS/3	1,0
T9	30	MS/2	0,0
T10	30	MS/2	1,0
T11	30	MS/3	0,0
T12	30	MS/3	1,0

Tabela 2 – Composição dos tratamentos para o experimento de *Vellozia punctulata* e *Vellozia jolyi*.

Tratamentos	Sacarose	Concentração de meio
T1	7,5	MS/2
T2	7,5	MS/3
T3	15	MS/2
T4	15	MS/3
T5	30	MS/2
T6	30	MS/3

2.2.6 Variáveis analisadas

O crescimento de *V. seubertiana* e *V. sincorana* foi avaliado após 60 dias e o de *V. punctulata* e *V. jolyi* após 120, devido a diferença no tempo de germinação e crescimento sendo mensurados: número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e porcentagem de enraizamento (% E).

2.2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos a verificação de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, utilizando o programa R Core Team, v 4.0.5 (2020). As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade e transformadas com a equação $(x+1)^{1/2}$, utilizando o programa SISVAR, v 5.3, desenvolvido por Ferreira (2011). Na variável porcentagem de enraizamento (% E) foram calculadas as raízes das médias e após o Arcoseno da raiz, sendo utilizado esse último valor para análise.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Composição de meio de cultura no crescimento inicial de *Vellozia*

As espécies de *Vellozia* apresentaram germinação, constatada pela emergência radicular, entre o 2° e 5° dia após semeadura no meio de cultura, com taxas de germinação acima de 75 % ao final dos 20 dias de avaliação (*V. seubertiana* 96 %; *V. sincorana* 94 %; *V. punctulata* 86 %; *V. jolyi* 77 %).

As médias de CPA de *V. seubertiana* e *V. jolyi* foram maiores no meio MS/2 com 15 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 3). O mesmo tratamento resultou em média superior para % E de *V. jolyi* (Tabela 3). A adição de 15 g.L⁻¹ de sacarose ao meio de cultura favoreceu o CPA nos dois meios testados para *V. punctulata* (Tabela 3). Nessa mesma espécie o NF e MSPA foi maior nos meios com 15 e 30 de sacarose (Figura 1A e B). Uma resposta similar em relação ao meio de cultura para crescimento *in vitro* foi observada para *Haberlea rhodopensis*, planta tolerante à dessecação e encontrada em afloramentos rochosos, usando o meio WPM e B5, ambos caracterizados por baixa concentração de nutrientes (DJILIANOV et al., 2005). Outro resultado semelhante ao de *V. seubertiana*, *V. jolyi* e *V. punctulata* foi obtido no estudo relacionado à quantidade de carboidrato e redução de macro ou micronutriente do meio de cultura com a espécie *Comanthera curralensis* também encontrada no campo rupestre (ALBUQUERQUE et al., 2016).

A MSR de *V. punctulata* foi maior em meio de cultura suplementado com 30 g.L⁻¹ (Figura 1C). Porém, para *V. sincorana* a concentração de 30 g.L⁻¹ reduziu o crescimento e enraizamento das plantas, não havendo diferenças quando cultivadas com 7 g.L⁻¹ e 15 g.L⁻¹ (Figura 1D, E e F). Em relação ao meio de cultura, o MS/2 proporcionou as maiores médias de MSPA e MSR para *V. jolyi* (Figura 2A e B). No entanto, o incremento em parte aérea e radicular para *V. punctulata* (% E e NF) foi obtido com o MS/3 (Figura 2C e D). O contraste no crescimento das espécies em diferentes concentrações de sacarose e nutrientes no meio de cultivo mostra a importância do estudo das necessidades nutricionais e respostas dos vegetais à redução do potencial hídrico do meio, que pode ser causada pelo aumento de sais e carboidratos (GEORGE, 2008).

O carvão ativado teve efeito positivo no CPA de *V. seubertiana* e *V. sincorana* (Figura 2E e F), o que pode ser relacionado a sua capacidade de adsorver substâncias liberadas no meio de cultivo ou encontradas no ágar que poderiam limitar o crescimento *in vitro* (GEORGE, 2008).

Tabela 3 – Comprimento e matéria seca da parte aérea (CPA e MSPA), número de folhas (NF) e porcentagem de enraizamento (% E) de três espécies de *Vellozia* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, aos 60 (*Vellozia seubertiana*) e aos 120 dias de cultivo *in vitro* (*Vellozia jolyi* e *Vellozia punctulata*).

Variáveis	Sacarose (g.L ⁻¹)	Concentração do meio de cultura	
		MS/2	MS/3
<i>Vellozia seubertiana</i>			
CPA (mm)	7,5	9,05 bB	13,22 aA
	15	17,06 aA	13,15 bA
	30	14,46 aA	14,33 aA
MSPA (g)	7,5	0,0019 aB	0,0019aA
	15	0,0036 aA	0,0019 bA
	30	0,0025 aB	0,0024aA
NF	7,5	4,63aB	5,76 aA
	15	7,59 aA	5,60 bA
	30	6,88 aA	6,80 aA
<i>Vellozia jolyi</i>			
CPA (mm)	7,5	6,72aAB	6,43aA
	15	8,59aA	3,04 bAB
	30	4,49aB	2,71aB
NF	7,5	6,96aAB	6,46aA
	15	7,83aA	2,50bB
	30	4,93aB	3,63aB
% E	7,5	77,22 aA	66,66 aA
	15	73,33aA	26,66bB
	30	46,66aB	36,66aB
<i>Vellozia punctulata</i>			
CPA (mm)	7,5	4,45bC	9,54aA
	15	9,68aA	9,15aA
	30	6,85bB	9,84aA

Médias com mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Médias de 6 repetições com 5 tubos.

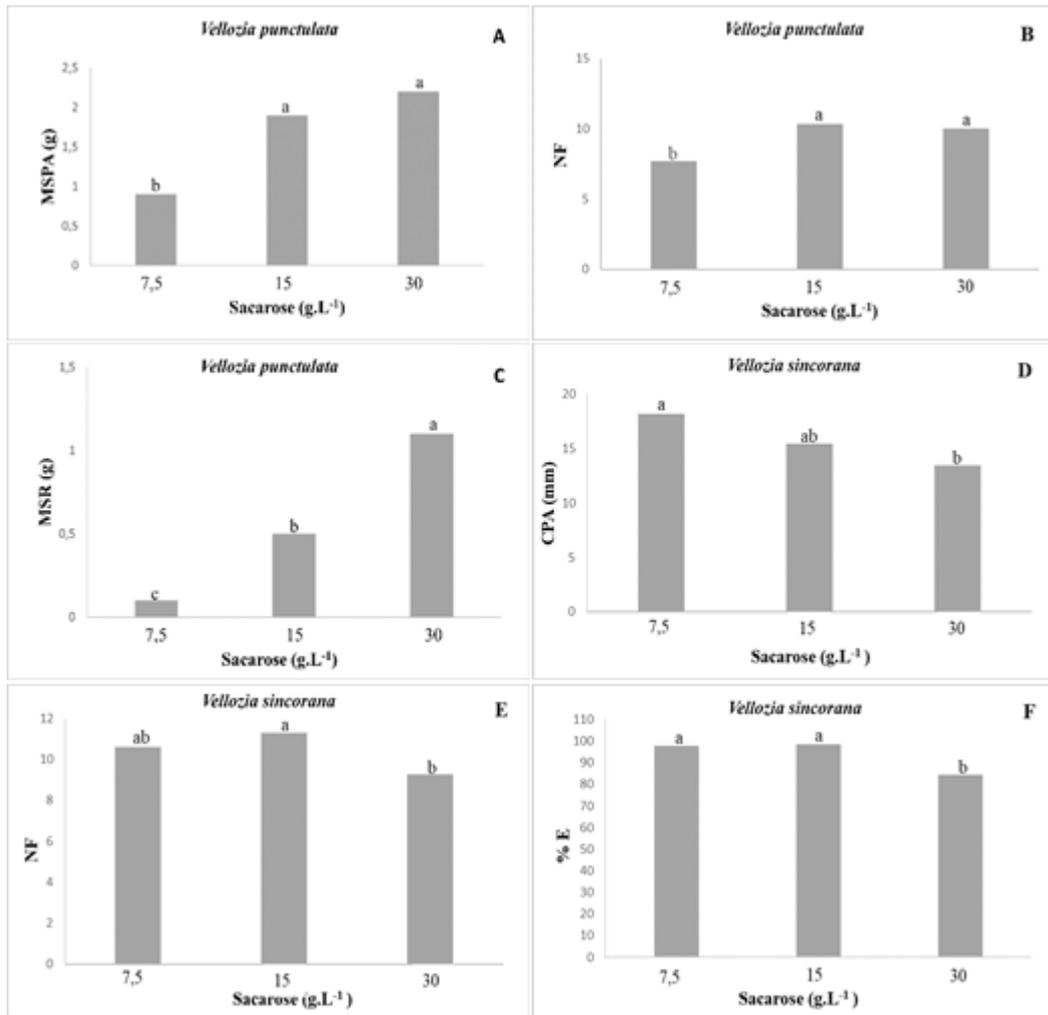


Figura 1- Comprimento da parte aérea – CPA, matéria seca da parte aérea – MSPA e da raiz – MSR, número de folhas - NF e porcentagem de enraizamento - % E de duas espécies de *Vellozia* em função de três concentrações de sacarose no meio de cultura *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

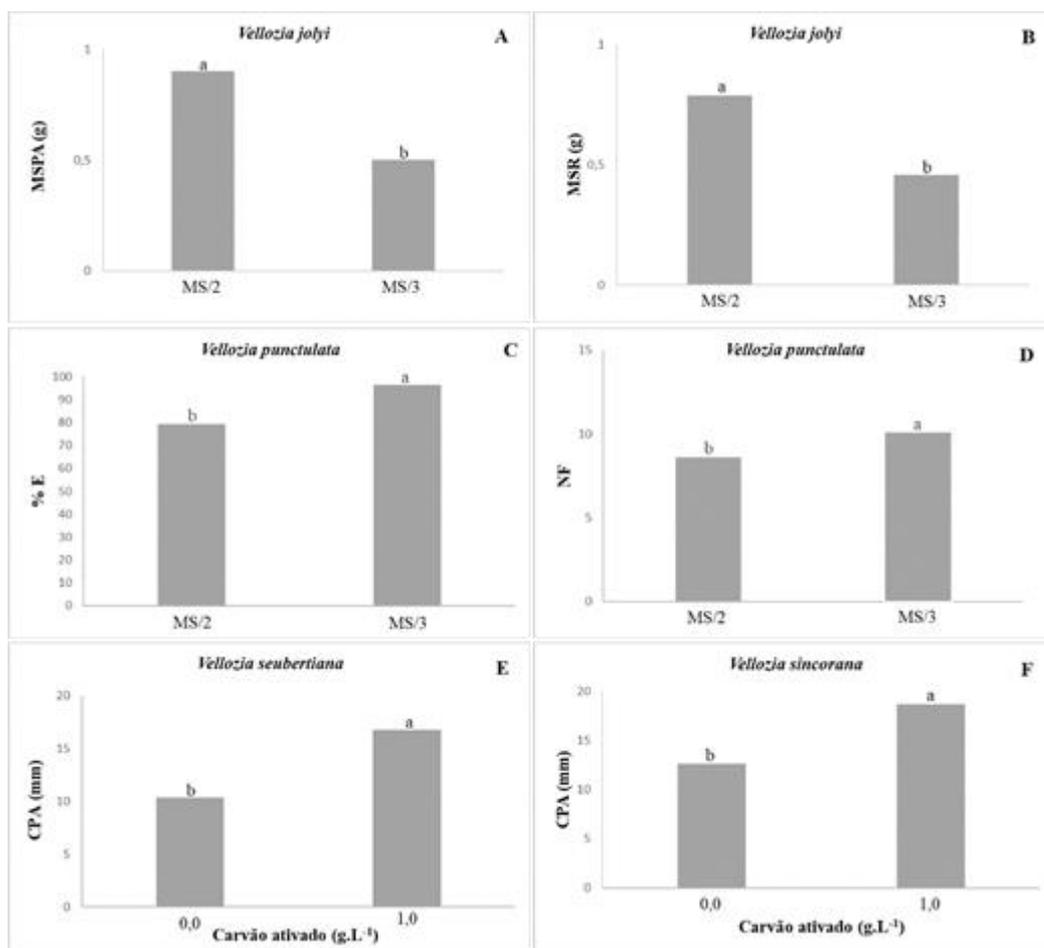


Figura 2- Comprimento da parte aérea – CPA, matéria seca da parte aérea – MSPA e da raiz – MSR, número de folhas - NF e porcentagem de enraizamento - % E de quatro espécies de *Vellozia* em função de duas concentrações de meio de cultura MS ou ausência e presença de carvão ativado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Em relação ao crescimento das raízes, as altas porcentagens produzidas por *V. jolyi*, *V. punctulata* e *V. sincorana* possibilitam economia de tempo e recursos no desenvolvimento dos protocolos para micropropagação dessas espécies, pois elimina a etapa de enraizamento *in vitro*. O acentuado desenvolvimento do sistema radicular pode ser relacionado ao ambiente das espécies, tanto pela disponibilidade reduzida de sedimento para *V. jolyi* e *V. punctulata*, que ocorrem em ilhas de vegetação nos afloramentos rochosos (CONCEIÇÃO et al., 2007), quanto pelo solo pobre em nutrientes relacionado aos ambientes contínuos, como os de *V. sincorana* (CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; CONCEIÇÃO, 2018).

2.4 CONCLUSÃO

O resultado é condizente com a dominância das Velloziaceae em áreas com restrições hídricas e solos pobres, tendo em vista a tendência de maior investimento na área subterrânea para potencializar a absorção de água e nutrientes, assim como reforça a importância da composição do meio de cultura para o crescimento inicial das espécies vegetais *in vitro* e o crescimento satisfatório das espécies em meio de cultura com redução nutricional como relatado na literatura para outras plantas do campo rupestre. Por fim, indicamos o MS/3 para *V. sincorana* e *V. punctulata* e o MS/2 para *V. jolyi* e *V. seubertiana*, ambos suplementados com 15 g.L⁻¹ de sacarose, assim como recomendamos ainda o carvão ativado para o cultivo *in vitro* de *V. seubertiana* e *V. sincorana*.

2.5 REFERÊNCIAS

- ABDELALEEM, K. G. et al. *In vitro* tissue culture technique as tools for micropropagation of *Lepidium sativum* L. plant under abiotic stress conditions. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, p. 128-132, 2019.
- ARAÚJO, T.; CONCEIÇÃO, A. A. High functional redundancy drives vegetation recovery in *Campo rupestre* affected by wildfires. **Flora**, v. 281, p.1-9, 2021.
- ALCANTARA, S.; REE, R. H.; MELLO-SILVA, R. Accelerated diversification and functional trait evolution in Velloziaceae reveal new insights into the origins of the campos rupestres' exceptional floristic richness. **Annals of Botany**, v. 122, p 165-180, 2018.
- ALBUQUERQUE, M. M. S. et al. *In vitro* establishment of *Comanthera curralensis* “sempre viva” native of Chapada Diamantina – Bahia. **Ciência Rural**, v. 46, p. 991-995, 2016.
- AYENSU, E. S. Biological and morphological aspects of the Velloziaceae. **Biotropica**, v. 5, p. 135-149, 1973.
- BORGES, et al. Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2020.
- BORGES, B. P. S. **Regeneração *in vitro* de *Vellozia sincorana* Ayensu & Smith**. 2015. 71p. Dissertação de Mestrado (Recursos Genético Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- BRUM, M. et al. Coordination of rooting depth and leaf hydraulic traits defines drought-related strategies in the campos rupestres, a tropical montane biodiversity hotspot. **Plant and Soil**, v. 420, p. 467-480, 2017.
- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica**, v. 23, p. 85-111, 2005.
- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R.; MEIRELLES, S. T. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of “Chapada Diamantina”, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 641-656, 2007.
- CONCEIÇÃO, A. A. A hot case for conservation: Candombá (*Vellozia pyrantha*). A flammable plant endemic to a national park is used to make a fire and threatened by fire suppression policy. **Journal for Nature Conservation**, v. 45, p. 118-121, 2018.
- CONCEIÇÃO, A. A. et al. Rupestrian Grassland Vegetation, Diversity, and Origin. In. G.W. Fernandes (ed.), **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**. Springer, 2016, p. 105-127.
- DJILIANOV, D. et al. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, p. 115-118, 2005.

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

FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 08 dez. 2021.

GALDIANO - JUNIOR, R. F. et al. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (*Orchidaceae*) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, v. 42, p. 801-807, 2012.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERC, G. J. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Netherlands, Springer, 2008. p. 29-64.

MELLO-SILVA, R. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Velloziaceae. **Rodriguésia**, v. 69, p. 259-262, 2018.

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

NEVES, S. P. S. **Fenologia biologia floral e polinização de espécies de Velloziaceae Endl. em área de campo rupestre na Chapada Diamantina**. Bahia. Brasil. 2009. 67f. Mestrado (Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

OLIVEIRA, R. S. et al. Mineral nutrition of campos rupestres plant species on contrasting nutrient-impooverished soil types. **New Phytologist**, v. 205, p.1183-1194, 2015.

OLIVEIRA, J. et al. Efficient *in vitro* plantlet development and acclimatization of *Cattleya elongata* Barb. Rodr., a Brazilian endemic and neglected species. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 77- 82, 2021.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020.

REZENDE, S. V. et al. *In vitro* seed germination and plant growth of “cabeça-de-frade” (Cactaceae). **Revista Caatinga**, v. 34, p. 1-8, 2021.

SILVEIRA, F. A. O. et al. Ecology and Evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant Soil**, v. 403, p. 129-152, 2016.

CAPÍTULO III

ESTRESSE HÍDRICO COMO INDUTOR DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* EM QUATRO ESPÉCIES DE *VELLOZIA* DA CHAPADA DIAMANTINA

Feira de Santana, 2022

RESUMO

O estresse hídrico prejudica o crescimento das plantas, causando a morte em casos extremos. Estudos *in vitro* com espécies tolerantes ao estresse podem ser a base para o melhoramento genético, visando minimizar esses danos, além de fornecer um ambiente controlado para avaliações bioquímicas e fisiológicas de plantas sob estresse. A família Velloziaceae possui espécies tolerantes à dessecação e resistentes ao fogo, tornando-se um material valioso para a análise de mecanismos de proteção e resposta reprodutiva ao estresse. O objetivo foi avaliar o estresse hídrico como gatilho para multiplicação *in vitro* e seu efeito na resposta bioquímica de quatro espécies de *Vellozia*. Experimentos independentes foram realizados com concentrações de sacarose + manitol e polietilenoglicol (PEG6000), ambos em meio de cultura MS. No teste com sacarose + manitol, foram observadas brotações em todas as espécies com maiores números para *V. punctulata* e *V. jolyi*, com diferença estatística entre os tratamentos apenas para *V. pyrantha*. O PEG6000 não influenciou a indução de brotações e interferiu na porcentagem de sobrevivência de todas as espécies. A maior concentração de PEG6000 (150 g.L⁻¹) aumentou o teor de prolina de *V. pyrantha*. A resistência ao estresse hídrico foi encontrada para as quatro espécies de *Vellozia*, devido à sua capacidade de sobreviver e se reproduzir em altas concentrações de osmorreguladores. Há indícios de que a prolina seja um dos osmoprotetores de Velloziaceae.

Palavras Chaves: Propagação *in vitro*. Osmorreguladores. Prolina. Espécies tolerantes a estresse.

ABSTRACT

Water stress impairs plant growth, causing death in extreme cases. *In vitro* studies with stress-tolerant species can be the foundation for genetic improvement aimed at minimizing these damages, as well as providing a controlled environment for biochemical and physiological assessments of plants under stress. The Velloziaceae family has desiccation-tolerant and fire-resistant species, making it valuable material for the analysis of protection mechanisms and reproductive response to stress. The objective was to evaluate water stress as a trigger for *in vitro* multiplication and its effect on the biochemical response of four stress-tolerant species of *Vellozia*. Independent experiments were set up with concentrations of sucrose + mannitol and polyethylene glycol (PEG₆₀₀₀), both in MS culture medium. In the test with sucrose + mannitol, shoots were observed in all species with higher numbers for *V. punctulata* and *V. jolyi*, with statistical difference between treatments only for *V. pyrantha*. PEG₆₀₀₀ did not influence shoot induction and interfered with the survival percentage of all species. The highest concentration of PEG₆₀₀₀ (150 g.L⁻¹) increased the proline content of *V. pyrantha*. Resistance to water stress was found for the four species of *Vellozia*, due to their ability to survive and reproduce in high concentrations of osmoregulators. There are indications that proline is one of the osmoprotectants of Velloziaceae.

Keywords: *In vitro* propagation. Osmoregulator. Proline. Stress-tolerant species

3.1 INTRODUÇÃO

O estresse hídrico é um dos fatores abióticos que causa elevado prejuízo no crescimento do vegetal e no cultivo agrícola (RAI; RAI, 2020), pois provoca alterações que podem ser severas a depender da duração do estresse (HOPKINS, 2008; BITA; GERATS, 2013), sendo em alguns casos capaz de antecipar a floração e reprodução de plantas tolerantes (HOPKINS, 2008). Geralmente ocorre em ambientes sob secas, variação extrema de temperatura, solo salino e alta intensidade luminosa (FAROOQI et al., 2020).

Restrição hídrica e alta intensidade luminosa são fatores de estresse marcantes em ambientes da região tropical onde há elevada concentração de espécies de Velloziaceae (POREMBSKI; BATHLOTT, 2000). Apesar de espécies de Velloziaceae serem típicas na África, elas predominam nos campos rupestres da região Neotropical (ALCANTARA et al., 2018), onde persistem à passagem recorrente do fogo e rebrotam, como *Vellozia pyrantha* A.A.Conc e *Vellozia seubertiana* Goethart & Henrard (CONCEIÇÃO et al., 2016), enquanto outras são tolerantes à dessecação, como *Vellozia punctulata* Seub e *Vellozia jolyi* L.B.Sm, que suportam extremo déficit hídrico e são capazes de entrar em anabiose (CONCEIÇÃO et al., 2007), ou seja, interromper suas funções metabólicas com posterior retomada do seu funcionamento normal (DINAKAR et al., 2012).

Ecossistema com condição ambiental extrema (seca) como o campo rupestre pode atuar como filtro na seleção de reprodução vegetativa, diante da tendência do vegetal emitir novos ramos em ambiente seco (CHOMICKI, 2021). A rebrota depende da proteção, desenvolvimento e banco de gemas viáveis do vegetal, que possibilitam a persistência da planta diante de vários tipos de distúrbios (CLARKE et al., 2013). A compreensão e previsão das respostas dos vegetais são importantes diante das mudanças climáticas, que tendem a intensificar os estresses abióticos (PAUSAS et al., 2015). Essa perpetuação do vegetal por meio de rebrota baseia-se na manutenção de banco de gemas, que pode ser oriundo de bulbo, rizoma, tubérculo, gemas axilares dormentes e fragmento dos vegetais (KLIMES~OVA'; KLIMES, 2007; CLARKE et al., 2013). A mediação de resposta dos vegetais tolerantes a estresse perpassa por mecanismos que minimizam danos através da produção de substâncias osmorreguladoras e protetoras como a glicina, sorbitol e a prolina, uma das mais difundidas (MOLINARI et al., 2007; TAIZ et al., 2017).

Estudos que investigam mecanismos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao estresse vêm sendo realizados com a utilização da cultura de tecidos vegetais (CLAEYS et al., 2014; MOYANKOVA et al., 2014; WU et al., 2017; MOLLO et al., 2019), um conjunto de

técnicas biotecnológicas que permite a condução de experimentos em ambiente controlado e redução no espaço físico e tempo de coleta dos resultados, quando comparado a trabalhos em campo (GEORGE; DEBERGH, 2008). Durante a micropropagação, a etapa de multiplicação que visa a produção de brotos, sofre influência de vários fatores como o balanço entre reguladores vegetais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e a concentração de sacarose, com papel no crescimento da planta e osmorregulação do meio de cultura (VINTERHALTER, 1997; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CAO et al., 2003). Além da sacarose, o manitol e o polietilenoglicol (PEG) são comumente adicionados no meio de cultivo a fim de simular estresse hídrico, o que permite a regeneração de brotos para seleção de plantas com características de interesse (RAI et al., 2011).

O cultivo *in vitro* utilizando o estresse como estímulo à regeneração vegetativa de Velloziaceae ainda é incipiente, sendo reportada a multiplicação *in vitro* de *V. pyrantha* em resposta ao estresse térmico, com a exposição da planta diretamente ao fogo por tempo reduzido (BORGES et al. 2020). No caso de estresse hídrico, a adição de alta concentração de sacarose ao meio de cultivo pode induzir a regeneração vegetativa, como em *Vaccinium corymbosum* L. (CAO et al., 2003) e *Solanum tuberosum* L. (VINTERHALTER et al., 1997). Assim, considerando o conhecimento de ativação de gemas laterais em ambientes secos (ZEPPEL et al., 2015; CHOMICKI, 2021) e a possibilidade de maior frequência de espécies rebrotadoras com gemas axilares dormentes em ambiente extremo como campo rupestre, hipotetizamos que espécies adaptadas a sobrevivência sob períodos severamente secos, responderiam ao estresse hídrico *in vitro* com a rebrota. O objetivo do estudo foi avaliar o estresse hídrico como gatilho para a multiplicação *in vitro* e seu efeito na resposta bioquímica de espécies de *Vellozia*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Espécies estudadas

As quatro espécies de *Vellozia* estudadas apresentam hábito herbáceo (*V. punctulata* e *V. jolyi*) e arbustivo (*V. seubertiana* e *V. pyrantha*) com ocorrência no campo rupestre da Chapada Diamantina. A *V. punctulata* com altura média de 0,80 m e *V. jolyi* de 0,20 m são tolerantes a dessecação e ocorrem em locais com baixa disponibilidade hídrica, sendo encontradas em moitas sob afloramentos rochosos (CONCEIÇÃO et al., 2007; NEVES, 2009). *V. pyrantha* com cerca de 1,30 m de altura ocorre entre rochas é caracterizada por resina inflamável e floração dependente do fogo (CONCEIÇÃO, 2018), e *V. seubertiana* com 0,60 a 2,0 m de altura possui indícios de floração desencadeada pelo fogo e é encontrada em ambiente arenoso (NEVES, 2009); ambas com distribuição em vegetação contínua de solo pobre em nutrientes.

3.2.2 Condições de cultivo

Os estudos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) e a análise de prolina foi realizada no Laboratório de Germinação (LAGER), ambos na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14h com radiação fotossintética de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em todos os experimentos os meios de cultura foram solidificados com 0,7% de ágar (exceto ensaio com PEG) e após ajuste do pH para $5,7 \pm 1$ foram autoclavados à temperatura de 121°C por 15 minutos.

3.2.3 Coleta das sementes

As sementes foram coletadas em campos rupestres, especificamente *V. pyrantha* na Serra do Candombá ($12^\circ 33' \text{S}$ $041^\circ 28' \text{W}$), no Parque Nacional da Chapada Diamantina, Palmeiras, Bahia, enquanto as das demais espécies foram coletadas no Parque Municipal de Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia: *V. seubertiana* ($12^\circ 59' \text{S}$ $041^\circ 20' \text{W}$), *V. punctulata* ($12^\circ 59' \text{S}$ $041^\circ 20' \text{W}$) e *V. jolyi* ($12^\circ 59' \text{S}$ $041^\circ 20' \text{W}$). Após a coleta, as sementes foram

retiradas das cápsulas e armazenadas em sacos de papel na geladeira em temperatura de 6 a 10°C, por três meses.

3.2.4 Germinação *in vitro*

As sementes foram lavadas em água de torneira com detergente para retirada das impurezas superficiais, e direcionadas para a câmara de fluxo laminar onde foram desinfestadas com álcool a 70 % (1´) e hipoclorito a 2,5% (10´), sendo adicionado a imersão em fungicida Bendazol (10´) e aumento do tempo no hipoclorito (15´) para *V. punctulata* e *V. seubertiana* devido a persistência de contaminação fúngica e bacteriana observada em ensaios preliminares.

As sementes de *V. jolyi*, *V. seubertiana* e *V. pyrantha* foram inoculadas em frascos com 50 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas (MS/2) e para *V. punctulata* utilizou-se um terço das concentrações salinas (MS/3). A suplementação do meio de cultura foi feita com 30 g. L⁻¹ de sacarose para *V. pyrantha* e 15 g. L⁻¹ para as demais espécies, de acordo com os resultados observados no estabelecimento *in vitro* das espécies, em ensaios preliminares. Três meses após a germinação, as plantas foram utilizadas para os experimentos de multiplicação.

3.2.5 Efeito do estresse hídrico com sacarose e manitol na multiplicação *in vitro*

Plantas germinadas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura MS/2 (*V. jolyi*, *V. seubertiana* e *V. pyrantha*) ou MS/3 (*V. punctulata*). O meio foi suplementado pela combinação de diferentes concentrações de sacarose (30 controle; 75; 120 g.L⁻¹) e manitol (0,0; 15,96 g.L⁻¹) para a espécie *V. pyrantha*, e para as demais espécies foram utilizadas 15 controle; 45 e 60 g.L⁻¹) de sacarose combinadas com manitol (0,0; 7,9 g.L⁻¹). Nos tratamentos das espécies *V. pyrantha* e *V. seubertiana* foi acrescido 1 g.L⁻¹ de carvão ativado ao meio de acordo com resultados observados no estabelecimento *in vitro* da espécie em ensaios preliminares.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, totalizando 5 tratamentos, compostos por 6 repetições com 3 parcelas (*V. seubertiana* e *V. pyrantha*) e 6 repetições com 2 parcelas cada (*V. punctulata* e *V. jolyi*).

3.2.6 Efeito do estresse hídrico com polietilenoglicol (PEG₆₀₀₀) na multiplicação *in vitro*, no conteúdo relativo de água foliar (CRAf) e de prolina

Plantas germinadas *in vitro* foram inoculadas em meio MS/2 (*V. seubertiana*, *V. pyrantha* e *V. jolyi*) ou MS/3 (*V. punctulata*), suplementados com 50; 100 e 150 g.L⁻¹ de polietilenoglicol - PEG₆₀₀₀ para *V. seubertiana* e *V. pyrantha*; e 50 e 150 g.L⁻¹ para *V. jolyi* e *V. punctulata*, utilizando o controle 0.0 g.L⁻¹ de PEG₆₀₀₀ para todas as espécies. O papel germitest foi utilizado como suporte da planta no meio líquido, o qual foi suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose para a *V. pyrantha* e 15 g.L⁻¹ para as demais espécies.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, cada tratamento continha 9 repetições com 2 parcelas para *V. pyrantha* e *V. seubertiana* e 10 repetições cada uma com 1 parcela para *V. jolyi* e *V. punctulata*.

O CRAf foi obtido utilizando 6 plantas (3 folhas por planta) de cada tratamento com a fórmula CRAf (%) = $(MFf-MSf/MTf-MSf \times 100)$ conforme descrito por Weatherley (1950), em que MFf é a massa fresca da folha, MTf a massa túrgida da folha e MSf a massa seca da folha, enquanto a quantificação de prolina foi realizada de acordo com o método de Bates (1973), utilizando 100 mg de massa fresca das folhas para produção do extrato com ácido sulfossalicílico 3 %. As amostras para as análises foram retiradas do controle e do tratamento com 150 g.L⁻¹ de PEG após 10 dias de cultivo *in vitro*.

3.2.7 Variáveis analisadas

Após 45 dias da montagem dos experimentos de multiplicação foram avaliados: porcentagem de sobrevivência (S%), porcentagem de plantas responsivas a formação de brotos (%PR), número de brotos por planta (NB), comprimento do maior broto (CMB), número de folhas (NF), matéria seca (MS) e número de raízes do maior broto (NR).

3.2.8 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada com o teste Shapiro-Wilk utilizando o programa R Core Team, v 4.0.5 (2020). As médias obtidas com os valores das parcelas foram comparadas pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade e as variáveis NB, CMB, NF e MS transformadas com a raiz quadrada de $y + 0.5 - \sqrt{y + 0.5}$ utilizando o programa SISVAR,

v 5.3, desenvolvido por Ferreira (2011). Regressão linear foi realizada com as médias obtidas nas diferentes concentrações de PEG no mesmo programa citado acima.

3.3 RESULTADO

3.3.1 Efeito do estresse hídrico com sacarose e manitol na multiplicação *in vitro*

As espécies apresentaram altas taxas de sobrevivência em todos os tratamentos analisados, no entanto, as médias obtidas nos tratamentos com 60 g.L⁻¹ de sacarose + 7,9 g.L⁻¹ de manitol para *V. seubertiana* (83,33 %) foram significativamente inferiores aos demais tratamentos (Figura 1 A). Nas demais espécies não houve diferença na porcentagem de sobrevivência entre os tratamentos (Figura 1 B-D; Figuras 2 e 3).

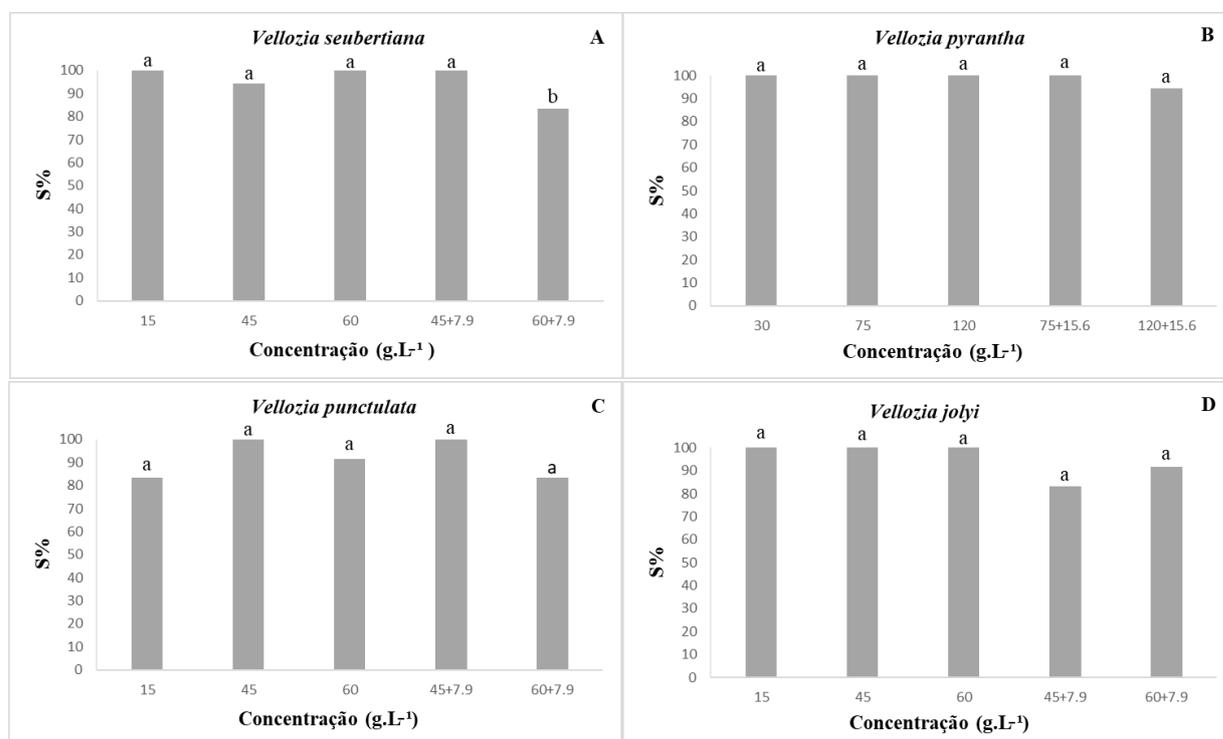


Figura 1 – Porcentagem de sobrevivência (S%) de quatro espécies do gênero *Vellozia* submetidas a diferentes concentrações de sacarose combinada com 7,9 g.L⁻¹ ou 15,6 g.L⁻¹ de manitol, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Controle - 30 g.L⁻¹ de sacarose para *Vellozia pyrantha* e 15 g.L⁻¹ de sacarose para as demais espécies. Médias com mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

No tratamento com alta concentração dos agentes osmóticos foi observado sinal de estresse, como mudança na coloração das folhas com tons violeta nas espécies *V. pyrantha*, *V. punctulata* e *V. jolyi* (Figuras 2 e 3).

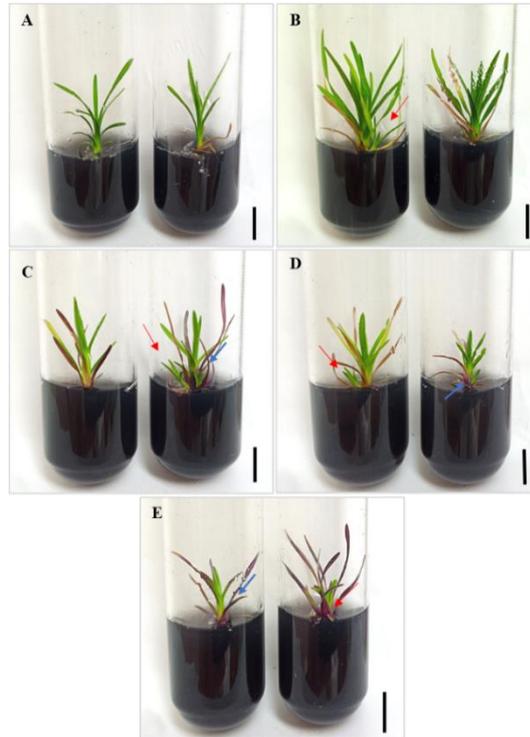


Figura 2 - *Vellozia pyrantha* submetida a diferentes concentrações de sacarose combinadas com manitol: controle - 30 g.L⁻¹ sacarose (A), 75 g.L⁻¹ sacarose (B), 120 g.L⁻¹ sacarose (C), 75 g.L⁻¹ sacarose + 15,6 g.L⁻¹ manitol (D) e 120 g.L⁻¹ sacarose + 15,6 g.L⁻¹ manitol (E) aos 45 dias de cultivo *in vitro*. A seta vermelha indica o broto. A seta azul indica folha em tom lilás. Escala da barra = 1 cm

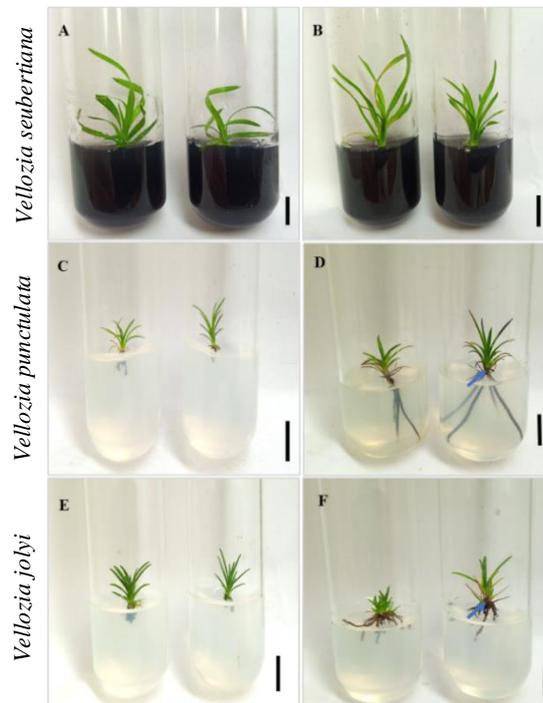


Figura 3 - Plantas de três espécies do gênero *Vellozia* submetidas a diferentes concentrações de sacarose combinada com manitol: controle - 30 g.L⁻¹ sacarose (A, C e E) e 60 g.L⁻¹ sacarose + 7,9 g.L⁻¹ manitol (B, D e F), aos 45 dias de cultivo *in vitro*. A seta azul indica folha em tom lilás. Escala da barra = 1 cm

Nos experimentos com *V. punctulata* e *V. jolyi* observou-se brotos no controle e demais tratamentos, enquanto *V. seubertiana* emitiu brotos em três dos tratamentos analisados. Nas três espécies não houve diferença estatística entre os tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1). Os maiores números de gemas axilares ativadas foram observados para *V. punctulata* seguido por *V. jolyi* (Tabela 1).

Tabela1– Número de brotos (NB) e porcentagem de plantas responsivas (% PR) de três espécies do gênero *Vellozia* submetida a diferentes concentrações de sacarose combinada com manitol, aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Sacarose (g.L ⁻¹)	Manitol (g.L ⁻¹)	NB	% PR
<i>Vellozia punctulata</i>			
15 (controle)	-----	0,33 a	25,00 a
45	-----	1,41 a	50,00 a
60	-----	1,00 a	41,66 a
45	7,9	0,91 a	50,00 a
60	7,9	0,66 a	41,66 a
<i>Vellozia jolyi</i>			
15 (controle)	-----	0,16 a	8,33 a
45	-----	1,50 a	41,66 a
60	-----	0,50 a	25,00 a
45	7,9	0,75 a	25,00 a
60	7,9	0,83 a	33,00 a
<i>Vellozia seubertiana</i>			
15 (controle)	-----	0,0 a	0,00 a
45	-----	0,16 a	11,11 a
60	-----	0,22 a	16,66 a
45	7,9	0,05 a	5,55 a
60	7,9	0,0 a	0,00 a

Médias com mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

Os tratamentos de estresse influenciaram ($P \leq 0,05$) o NB, % PR, CMB e NF dos brotos de *V. pyrantha* (Tabela 1 Apêndice C). As maiores médias para NB, % PR e NF foram obtidas nos tratamentos com 75 e 120 g.L⁻¹ de sacarose e com 120 g.L⁻¹ de sacarose + 15,6

g.L⁻¹ de manitol (Tabela 2). Os maiores comprimentos de brotos da mesma espécie foram obtidos utilizando 75 ou 120 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de brotos (NB), porcentagem de plantas responsivas (% PR), comprimento do maior broto (CMB) e número de folhas por broto (NF) de *Vellozia pyrantha* submetida a diferentes concentrações de sacarose combinada com manitol, aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Sacarose (g.L ⁻¹)	Manitol (g.L ⁻¹)	NB	% PR	CMB (mm)	NF
30 (controle)	-----	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
75	-----	0,44 a	27,77 a	2,14 a	0,77 a
120	-----	1,16 a	41,66 a	2,13 a	1,08 a
75	15,6	0,11 b	11,11 b	0,39 b	0,16 b
120	15,6	0,72 a	27,77 a	0,61 b	0,55 a

Médias com mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

3.3.2 Efeito do estresse hídrico com PEG₆₀₀₀ na multiplicação *in vitro*, no conteúdo relativo de água foliar (CRAf) e de prolina

A alta concentração de PEG₆₀₀₀ no meio de cultivo provocou degradação de clorofila, observada pela coloração marrom das folhas (Figuras 4 e 5). O PEG não induziu broto em nenhuma das espécies estudadas. A adição desse osmorregulador no meio de cultura interferiu na porcentagem de sobrevivência de todas as espécies de *Vellozia* (Tabela 2 Apêndice C), apresentando variação linear com decréscimo em função do aumento das concentrações, e menores taxas para *V. seubertiana* (38,88 %) *V. pyrantha* (5,55 %), *V. punctulata* (60%) e *V. jolyi* (10%) nos tratamentos com adição de 150 g.L⁻¹ PEG₆₀₀₀ (Figura 6).

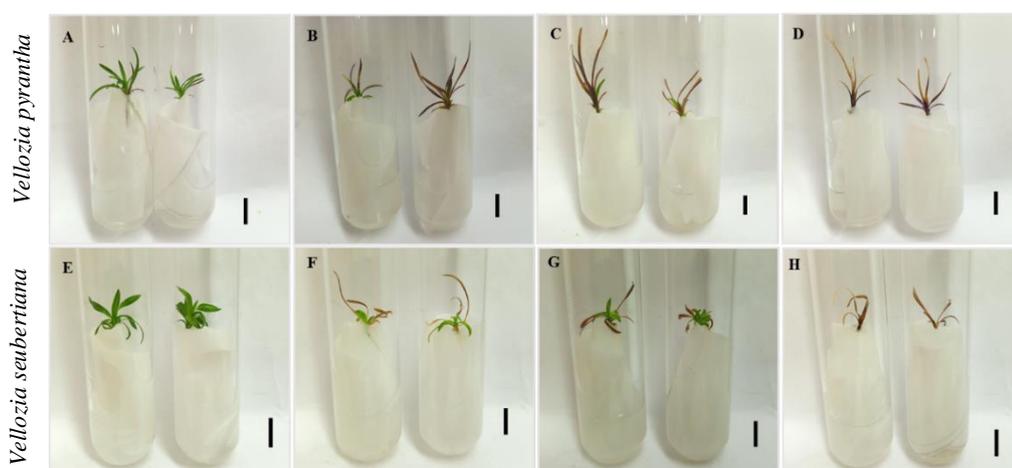


Figura 4 – Plantas de duas espécies do gênero *Vellozia* submetidas a diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG₆₀₀₀): Controle - 0,00 g.L⁻¹ (A e E), 50 g.L⁻¹ (B e F), 100 g.L⁻¹ (C e G), 150 g.L⁻¹ (D e H), aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Escala da barra = 1 cm.

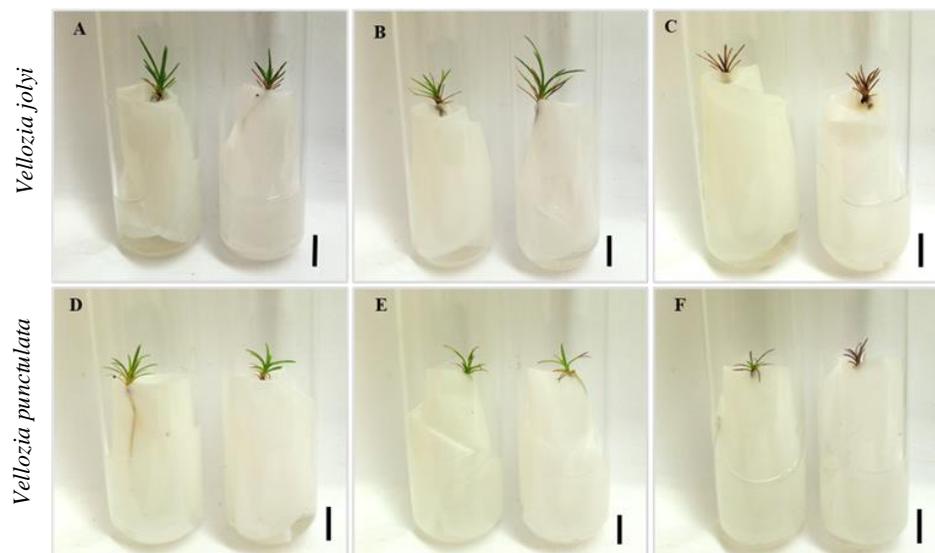


Figura 5 – Plantas de duas espécies do gênero *Vellozia* submetidas a diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG₆₀₀₀): Controle - 0,00 g.L⁻¹ (A e D), 50 g.L⁻¹ (B e E), 150 g.L⁻¹ (C e F), aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Escala da barra = 1 cm

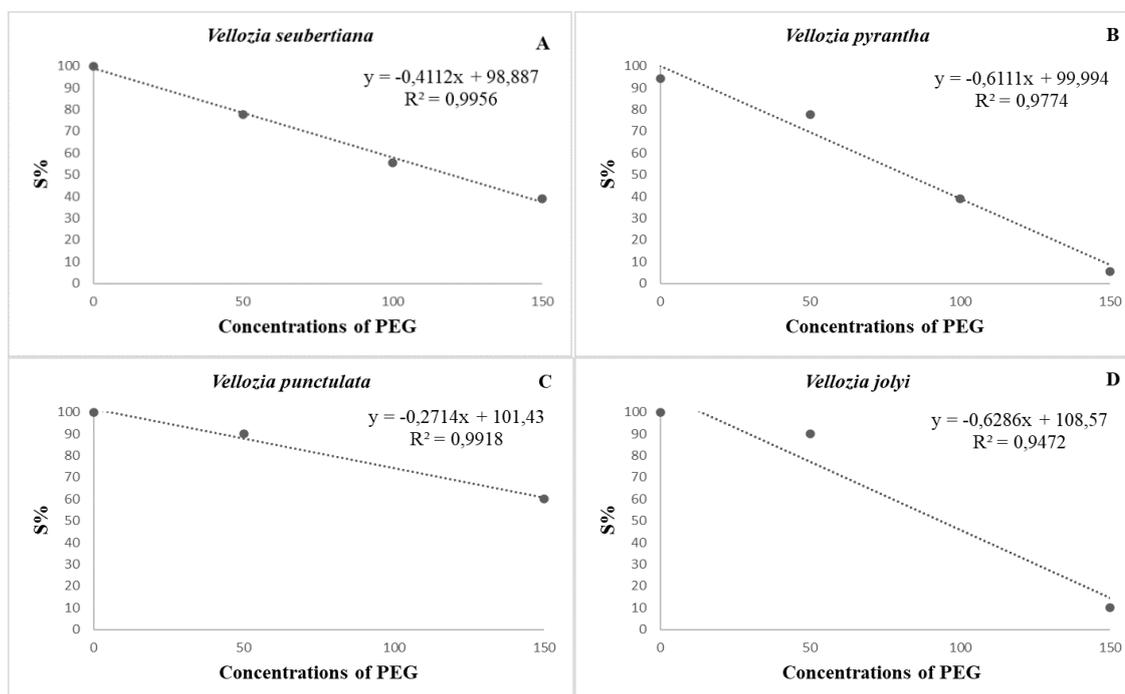


Figura 6 – Porcentagem de sobrevivência de plantas (% S) do gênero *Vellozia* submetidas a diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG₆₀₀₀) após 45 dias de cultivo *in vitro*.

A análise de variância mostrou diferença no conteúdo de prolina e no CRAf% entre as espécies (Tabela 3 e 4 Apêndice C). O conteúdo de prolina aumentou para *V. pyrantha* no

meio com 150 g.L⁻¹ de PEG, no entanto não diferiu do controle para *V. seubertiana* (Tabela 3).

Tabela 3 – Conteúdo de prolina de duas espécies do gênero *Vellozia* após 10 dias de cultivo *in vitro* em alta concentração de polietilenoglicol (PEG₆₀₀₀).

PEG ₆₀₀₀ (g.L ⁻¹)	<i>Vellozia pyrantha</i>	<i>Vellozia seubertiana</i>
Controle	9,46 b	10,25 a
150	16,11 a	11,56 a

Médias com mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

O CRAf % decaiu no tratamento com PEG (150 g.L⁻¹) em *V. seubertiana* e *V. pyrantha*, porém em *V. punctulata* não houve diferença entre a concentração utilizada e o controle (Tabela 4).

Tabela 4 – Conteúdo relativo de água foliar (CRAf) de três espécies do gênero *Vellozia* após 10 dias de exposição a alta concentração de polietilenoglicol (PEG).

PEG (g.L ⁻¹)	<i>Vellozia pyrantha</i>	<i>Vellozia seubertiana</i>	<i>Vellozia punctulata</i>
Controle	65,16 a	76,51 a	77,27 a
150	53,18 b	52,03 b	72,02 a

Médias com mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Efeito do estresse hídrico: sacarose e manitol na multiplicação *in vitro*

A elevada taxa de sobrevivência das espécies de *Vellozia* submetidas ao estresse hídrico pode ser relacionada ao ambiente do campo rupestre onde elas vivem, que é marcado pela presença de um substrato raso e suscetível a períodos secos recorrentes (CONCEIÇÃO et al., 2007; FERNANDES, 2016). Um cenário que reforça a exposição sucessiva a eventos de estresse como um estímulo para produção de mecanismos de proteção das plantas, podendo culminar em resistência ou tolerância de espécies vegetais (BRUCE et al., 2007),

A formação de brotos no controle e nos demais tratamentos de estresse hídrico em *V. punctulata* e *V. jolyi* revela boa capacidade de reprodução vegetativa, mesmo em ambiente com reduzida disponibilidade hídrica, o que pode ser relacionado a tolerância à dessecação, já que essa resposta também foi observada em outra planta tolerante à dessecação, *Haberlea rhodopensis*, de habitat similar ao das espécies de nosso estudo (DJILIANOV et al., 2005). A reduzida ativação de gemas axilares e a ausência de sinais visuais de estresse em *V. seubertiana* sugere resistência ao estresse hídrico, o que indica necessidade de maior concentração de sacarose para a planta responder ao estresse, similar ao detectado em ensaios preliminares com *V. pyrantha*.

A eficiência da sacarose na indução de brotos em *V. pyrantha* pode estar relacionada à dupla função da sacarose no meio de cultivo, como agente osmótico e suporte de carbono. O estresse hídrico causado pela sacarose possivelmente ativou vias fisiológicas relacionadas a produção de hormônios vegetais promotores da multiplicação, similarmente ao constatado em *Solanum tuberosum*, com ativação de genes associados a produção de citocinina, auxina e giberelina na fase de rebrota da planta (SUTTLE, 2007; BISOGNIN et al., 2018; GONG et al., 2021). A proliferação de brotos induzida por sacarose também foi constatada em outras espécies como *Vaccinium corymbosum* L. (Variedade Duke), em concentração de até 44 mM (15,06 g.L⁻¹) (CAO et al., 2003) e *Solanum tuberosum* L. (batata) em concentrações de 50 g.L⁻¹, 80 g.L⁻¹ e 100 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura (VINTERHALTER et al., 1997).

O efeito positivo da sacarose no crescimento *in vitro* em *Vellozia*, constatado pelo maior comprimento e número de folhas dos brotos (Tabela 2) (Figura 2 B e C), pode ser associado ao papel primordial da sacarose na cultura *in vitro*, que é o de servir de base para construção de esqueleto de carbono (GEORGE; DEBERGH, 2008).

A adição de manitol no meio de cultivo propiciou maior nível de estresse hídrico comparado com a sacarose, o qual é perceptível pelo decréscimo no crescimento dos brotos e no número de folhas (Figura 2 D e E). Essa redução pode ser associada a um menor potencial hídrico do meio provocando diminuição na absorção de carboidrato, água e consequente redução de expansão celular, o que desencadeia decréscimo na atividade celular e metabólica (TAIZ et al., 2017), justificando a avaliação do crescimento como uma característica relevante para mensuração do nível de estresse (CLAEYS et al., 2014).

A resposta peculiar das espécies estudadas, com manutenção da sobrevivência e emissão de brotos, demonstra capacidade de proteção celular contra efeitos deletérios do estresse hídrico, como a produção de antioxidante através da biossíntese de flavonóides, como a antocianina (HE et al., 2010; TAIZ et al., 2017), substância que possivelmente foi produzida pelas espécies *V. pyrantha*, *V. seubertiana* e *V. jolyi*, diante da observação dos tons lilás nas suas folhas. Uma resposta semelhante foi obtida utilizando células em suspensão de *Vitis vinifera* L, com maiores concentrações de antocianina no meio de cultivo com potencial osmótico reduzido pela adição de sacarose e manitol (DO; CORMIER, 1990). Essas substâncias têm a função de combater as espécies reativas de oxigênio (EROs), que embora tenham o importante papel na ativação de defesa contra estresse hídrico, sua elevação é deletéria para a estabilidade de membranas, do DNA e outras estruturas celulares (TAIZ et al., 2017).

3.4.2 Efeito do estresse hídrico com PEG na multiplicação *in vitro*, no conteúdo relativo de água foliar (CRAf) e de prolina

A redução na % S das espécies de *Vellozia* em alta concentração de PEG indica estresse hídrico severo. As plantas mostraram resposta genótipo dependente, destacando-se as maiores suscetibilidades ao estresse hídrico de *V. jolyi* e *V. pyrantha* em 150 g.L⁻¹ de PEG, com apenas 10 % e 5,55 % de sobrevivência respectivamente, em contraste com a faixa de 50 % de sobrevivência nas altas concentrações de PEG em *V. punctulata* e *V. seubertiana*, uma capacidade surpreendente de proteção e manutenção da estrutura celular após 45 dias *in vitro*, período relativamente longo de restrição hídrica. Além disso, destaca a diversidade de resposta, mesmo para espécies do mesmo gênero e vegetação (campo rupestre) relacionadas a estresses abióticos extremos, chamando atenção para a dependência entre carga genética, duração e intensidade do estresse hídrico (ZEPPEL et al., 2015).

A elevação de prolina em *V. pyrantha* sugere combate ao estresse hídrico, considerando sua função de proteção e manutenção da estrutura celular com ação osmorreguladora (RAI; RAI, 2020). A prolina também pode ser vantajosa como fonte alternativa de carbono e nitrogênio para a homeostase vegetal após estresse (TAIZ et al., 2017). Em geral, cada grupo vegetal tem preferência por um ou dois osmólitos compatíveis (TAIZ et al., 2017), provavelmente Velloziaceae acumula outro tipo de substância osmoprotetora como o sorbitol e a glicina betaína para minimizar os danos (TAIZ et al., 2017), pois houve redução no conteúdo relativo de água foliar (CRAf) de duas das espécies (*V. pyrantha* e *V. seubertiana*) no tratamento com 150 g.L⁻¹ de PEG, porém a quantificação de prolina não diferiu do controle para *V. seubertiana*.

A estabilidade do CRAf % em *V. punctulata* pode ser relacionada a sua tolerância a dessecação, pois resposta similar foi observada em outra Velloziaceae tolerante a dessecação, *Barbacenia purpúrea* Hook. com manutenção do potencial hídrico foliar após 8 dias de estresse hídrico e decréscimo apenas após 16 dias de estresse nas plantas analisadas em casa de vegetação no inverno (SUGUIYAMA et al., 2016).

3.5 CONCLUSÃO

O estudo é o primeiro a reportar reprodução vegetativa *in vitro* em espécies de *Vellozia* sob estresse hídrico induzido e os dados sugerem alteração do nível hormonal endógeno suficiente para reprodução clonal. Além disso, a resistência das espécies ao estresse hídrico forma um conjunto promissor para pesquisa de mecanismos acionados na proteção do vegetal e das vias fisiológicas ativadas na rebrota, os quais podem ser adaptados e utilizados com viés econômico em plantas cultivadas.

A sacarose foi eficiente para induzir brotos em *V. pyrantha* e não provocou nível de estresse visível em *V. seubertiana*. As espécies *V. punctulata* e *V. jolyi* têm potencial para fácil multiplicação *in vitro*.

O estresse hídrico com PEG₆₀₀₀ foi nocivo para as espécies de *Vellozia*, quando comparado ao estresse com sacarose + manitol. Há evidências de que a prolina é um dos mecanismos bioquímicos de proteção de *V. pyrantha*.

3.6 REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, S.; REE, R.H.; MELLO-SILVA, R. Accelerated diversification and functional trait evolution in Velloziaceae reveal new insights into the origins of the *campos rupestres*' exceptional floristic richness. **Annals of Botany**, v. 122, p.165-180, 2018.

BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in Plant Science Crop Science and Horticulture**, v. 4, 1-18, 2013.

BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BORGES, B. P. S. Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 709-713, 2020.

BISOGNIN, D. A. et al. QTL Analysis of Tuber Dormancy and Sprouting in Potato. **American Journal of Potato Research**, v. 95, p. 374-382, 2018.

BRUCE, T. J. A. et al. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, p. 603-608, 2007.

CAO, X et al. Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 255-259, 2003.

CONCEIÇÃO, A. A. A hot case for conservation: Candomba (*Vellozia pyrantha*), a flammable plant endemic to a national park is used to make a fire and threatened by fire suppression policy. **Journal for Nature Conservation**, v. 45, p. 1-12, 2018.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R.; MEIRELLES, S. T. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of “Chapada Diamantina”, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 641-656, 2007.

CONCEIÇÃO, A. A.; RAPINI, A.; CARMO, F. F.; BRITO, J. C.; SILVA, G. A.; NEVES, S. P. S.; JACOBI, C. M. Rupestrian Grassland Vegetation, Diversity, and Origin. in: Fernandes, G.W. (Ed.), Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil. Springer International Publishing Switzerland, p. 3-14. 2016.

CHOMICKI, G. Bringing Raunkiaer with plant architecture: unveiling the climatic drivers of architectural evolution in *Euphorbia*. **New Phytologist**, v. 231, p. 910-912. 2021.

CLAEYS, H et al. What Is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used *in Vitro* Stress Assays. **Plant Physiology**, v.165, p. 519-527, 2014.

CLARKE, P. J. et al. Resprouting as a key functional trait: how buds, protection and resources drive persistence after Fire. **New Phytologist**, v. 197, p. 19-35, 2013.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012.

DO, C. B.; CORMIER, F. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 143-146, 1990.

DJILIANOV, D. et al. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, p. 115-118, 2005.

FERNANDES, G. W. The Megadiverse Rupestrian Grassland, In: FERNANDES, G. W. (Ed.), Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil. Springer International Publishing Switzerland, p. 3-14. 2016.

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

FAROOQI, Z. U. R.; AYUB, M. A.; REHMAN, M. Z.; SOHAIL, M. I.; USMAN, M.; KHALID, H.; NAZ, K. Regulation of drought stress in plants. In: TRIPATHI, D. K.; CHAUHAN, D. K., PRASAD, S. M., RAMAWAT, N.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; DUBEY, N. K. (Eds.), Plant Life under Changing Environment Responses and Management. Elsevier Inc., p.77-104. 2020.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA, 1998. p.183-260.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. J. D. (Eds.), Plant propagation by tissue culture. Springer: Dordrecht. 2008.

GONG, H. et al. Molecular regulation of potato tuber dormancy and sprouting: a mini-review. **Plant Biotechnology Reports**, v. 15, p. 417-434, 2021.

HE, F. et al. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. **Molecules**, v. 15, p. 9057-909, 2010.

HOPKINS, G. W.; HUNER, N. P. A. 2008. Introduction to plant physiology. Fourth ed. John Wiley & Sons.

KLIMES'OVA', J.; KLIMES, L. Bud banks and their role in vegetative regeneration – A literature review and proposal for simple classification and assessment. Perspectives in Plant, **Ecology, Evolution and Systematics**, v. 8, p. 115-129, 2007.

POREMBSKI, A.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as center of diversity desiccation-tolerant vascular plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 19-28, 2000.

- MOLINARI, H. B. C. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 218-229, 2007.
- MOLLO, L. et al. Drought survival strategies of juvenile bromeliads of *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 139, p. 295-304. 2019.
- MOYANKOVA, D. Metabolic profiling of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* during desiccation and recovery. **Physiologia Plantarum**, v. 152, p. 675-687, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PAUSAS, J. G. Towards understanding resprouting at the global scale. **New Phytologist**, v. 209, p. 945-954, 2015.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020.
- RAI, M. K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection - An overview of the recent progress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 7, p. 89-98, 2011.
- RAI, K. K.; RAI, A. C. Drought Stress and Its Mitigation and Management Strategies in Crop Plants. In: ROYCHOWDHURY, R.; CHOUDHURY, S.; HASANUZZAMAN, M.; SRIVASTAVA, S. (Eds.), Sustainable agriculture in the era of climate mudance. Springer, p.143-168. 2020.
- SUTTLE, J. C. Dormancy and Sprouting, In: VREUGDENHIL, D. (Ed.), Potato Biology and Biotechnology: advances and perspectives. Published by Elsevier B. V, p.287-309. 2007.
- SUGUIYAMA, V. F. Physiological responses to water deficit and changes in leaf cell wall composition as modulated by seasonality in the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpúrea*. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 270-278, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, R. E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. 2017. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. sixth ed. Artmed, Porto Alegre.
- VINTERHALTER, D.; VINTERHALTER, B.; CALOVIC, M. The relationship between sucrose and cytokinins in the regulation of growth and branching in potato cv. désiree shoot cultures. **Acta Horticulturae**, v. 462, p. 319-323, 1997.
- WEATHERLEY, P. E. Studies in the water relations of the cotton plant. **New Phytologist**, v. 89, p. 81-97, 1950.
- WU, X.; ZENG, F.; ZHANG, G. PEG-simulated drought stress and spike *in vitro* culture are used to study the impact of water stress on barley malt quality. **Plant Growth Regulation**, v. 81, p. 243-252, 2017.
- ZEPEL, M. J. B. et al. Drought and resprouting plants. **New Phytologist**, v. 206, p. 583-589, 2015.

CAPÍTULO IV

IMPACTO DO ESTRESSE TÉRMICO NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E BIOQUÍMICA EM QUATRO ESPÉCIES DE *VELLOZIA*

RESUMO

A família Velloziaceae se destaca no campo rupestre pela ampla distribuição, por sua floração sincronizada e espécies adaptadas a estresses abióticos como seca e fogo. O estresse térmico tem impacto na produtividade da planta e dependendo da duração pode levá-la à morte, pois interfere na estabilidade das biomembranas com impacto a nível enzimático e proteico celular. O cultivo *in vitro* amplamente utilizado na propagação *ex situ* de espécies possibilita estudos fisiológicos e bioquímicos dos mecanismos de proteção contra o estresse. O objetivo deste estudo foi avaliar a reprodução vegetativa e a resposta bioquímica após exposição a alta temperatura (140 ± 3 °C) de quatro espécies do gênero *Vellozia* da Chapada Diamantina, Bahia. Nesse intuito, foi realizado experimento utilizando diferentes períodos (0,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 minutos) de exposição a alta temperatura (140 ± 3 °C) com posterior avaliação da regeneração de brotos *in vitro*, quantificação de prolina e conteúdo relativo de água foliar. A sobrevivência de *Vellozia* decaiu a partir de 6 e 8 minutos de permanência em alta temperatura. O estresse térmico induziu brotos em *V. pyrantha*, *V. jolyi* e *V. punctulata* com resultado significativo para número de brotos na última espécie citada. O conteúdo relativo de água (CRAf) decaiu em *V. pyrantha* após exposição a 6 minutos de estresse térmico. A alta temperatura não interferiu no conteúdo de prolina nas duas espécies analisadas. As quatro espécies de *Vellozia* são resistentes a alta temperatura. O estresse térmico foi eficiente para a estimular reprodução vegetativa em *V. punctulata*.

Palavras Chaves: Velloziaceae. Estresse térmico. Campo Rupestre. Prolina

ABSTRACT

The Velloziaceae family stands out in the campo rupestre for its distribution, for its synchronized flowering and species adapted to abiotic stresses such as drought and fire. Thermal stress has an impact on plant productivity and, depending on the duration, it can lead to death, as it interferes with the stability of biomembranes, impacting the enzymatic and cellular protein levels. The *in vitro* culture widely used in the *ex situ* propagation of species allows physiological and biochemical studies of the protection mechanisms against stress. The objective of this study was to evaluate the vegetative reproduction and the biochemical response after exposure to high temperature (140 ± 3 °C) of four species of the genus *Vellozia* from Chapada Diamantina, Bahia. For this purpose, an experiment was carried out using different periods (0.0; 4.0; 6.0; 8.0 and 10 minutes) of exposure to high temperature (140 ± 3 °C) with subsequent evaluation of shoot regeneration *in vitro*, quantification of proline and relative leaf water content. *Vellozia* survival decreased after 6 and 8 minutes of permanence at high temperature. Heat stress induced shoots in *V. pyrantha*, *V. jolyi* and *V. punctulata* with a significant result for shoot number in the last mentioned species. The relative water content (CRAf) decreased in *V. pyrantha* after exposure to 6 minutes of heat stress. The high temperature did not affect the proline content in the two species analyzed. The four species of *Vellozia* are resistant to high temperatures. Heat stress was efficient to stimulate vegetative reproduction in *V. punctulata*.

Keywords: Velloziaceae. Thermal stress. Rupestrian grassland. Proline.

4.1 INTRODUÇÃO

O estresse térmico, determinado pelo aumento ou redução da temperatura ótima para o vegetal, variações extremas de temperatura e incêndios em determinados ecossistemas modifica o padrão de movimento das moléculas e provoca mudanças na estrutura de biomembranas com impacto a nível fisiológico, bioquímico e molecular na planta, sendo coordenado pelo balanço entre intensidade, duração, frequência do estresse e genótipo vegetal (LACHERS et al., 2003; BITA; GERARTS et al., 2013; TAIZ et al. 2017; ALEEM et al., 2020; TIWARI et al., 2020).

O aumento da temperatura global tem provocado estresse térmico nos vegetais, com impacto na sua produtividade e por consequência na segurança alimentar mundial, de modo que o estudo de espécies tolerantes ao estresse térmico é valioso para produção e/ou recomendação de cultivares que atendam a cadeia produtiva ou possuam genes de interesse para o melhoramento genético (BITA e GERARTS et al., 2013; ALEEM et al., 2020). Espécies que são capazes de resistir ou tolerar o estresse térmico podem responder com produção de substâncias como a prolina, relacionada a proteção contra espécies reativas de oxigênio (ALEEM et al., 2020), auxiliando assim na manutenção da organização e função celular (TAIZ et al., 2017).

As plantas tolerantes à dessecação podem auxiliar a desvendar mecanismos de resposta ao estresse térmico. Nesse sentido, algumas pesquisas com espécies que possuem essa tolerância foram realizadas utilizando altas e baixas temperaturas com material vegetal seco e hidratado (KAPPEN, 1966; VIEWEG; ZIEGLER, 1969; EICKMEIE, 1986). Outro conjunto de vegetais, as plantas pirofíticas (resistentes ao fogo) que conseguem restabelecer sua parte aérea após a passagem do fogo (COUTINHO, 2002), também são importantes para o avanço no conhecimento relacionado ao estresse térmico, como no estudo de Borges et al. (2020), que relatou resposta positiva para multiplicação *in vitro* de *Vellozia pyrantha*, após contato com fogo, o que sugere capacidade de proteção a esse estresse.

Representantes desses grupos são encontrados no gênero *Vellozia* (Velloziaceae), que apresenta 97,5% de suas espécies restritas ao Brasil, a maioria delas endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (MELLO-SILVA, 2018). Esse ecossistema é marcado pela heterogeneidade ambiental e condições ambientais extremas como incêndios recorrentes em ambiente contínuo onde ocorrem as espécies arbustivas resistentes ao fogo *V. pyrantha* e *V. seubertiana* (CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; NEVES, 2009; SILVEIRA et al., 2016;

CONCEIÇÃO, 2018), e por secas periódicas no afloramento rochoso, local de distribuição de várias espécies tolerantes a dessecação como *V. punctulata* e *V. jolyi* (CONCEIÇÃO et al. 2007; NEVES, 2009; MELLO-SILVA, 2015).

O cultivo *in vitro* proporciona a base para explorar as vias fisiológicas, bioquímicas e moleculares de espécies pitorescas quanto ao gerenciamento da dessecação extrema e alta temperatura, além de possibilitar a regeneração e conservação desses genótipos *ex situ* (BARTELS; SALAMINI, 2001; DJILIANOV et al., 2005; GEORGE; DEBERGH, 2008; BORGES et al., 2020; YU et al. 2021). Não há relatos na literatura de estudos de propagação *in vitro* para *V. punctulata*, *V. jolyi* e *V. seubertiana*, sendo encontrado apenas um trabalho de cultivo *in vitro* para *V. pyrantha* (BORGES et al. 2020).

Desse modo, considerando o contato direto de *Vellozia seubertiana* e *Vellozia pyrantha* com incêndios recorrentes em vegetação contínua (NEVES, 2009; CONCEIÇÃO, 2018), assim como o aumento da temperatura do ar e a alta irradiação solar nos afloramentos rochosos (COUTINHO, 1990; POREMBSKI; BARTHLOTT, 2000), local onde ocorrem *Vellozia punctulata* e *Vellozia jolyi*, hipotetizamos que a exposição controlada dessas espécies a alta temperatura induziria resposta bioquímica de defesa e seria gatilho para a reprodução vegetativa *in vitro*. O objetivo deste estudo foi avaliar a reprodução vegetativa *in vitro* e a resposta bioquímica após exposição a alta temperatura de quatro espécies de *Vellozia* dos campos rupestres.

4.2 MATERIAL E METODO

4.2.1 Condições de cultivo

Os estudos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) e a análise de prolina foi realizada no Laboratório de Germinação (LAGER) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14h com radiação fotossintética de $60\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Em todos os experimentos os meios de cultura foram solidificados com 0,7% de ágar e após ajuste do pH para $5,7 \pm 1$ foram autoclavados à temperatura de 121°C por 15 minutos.

4.2.2 Coleta das sementes

As sementes de *V. pyrantha* foram coletadas em campo rupestre na Serra do Candombá ($12^{\circ}33'S\ 041^{\circ}28'W$), no Parque Nacional da Chapada Diamantina, Palmeiras, Bahia, enquanto as sementes das demais espécies foram coletadas em campo rupestre no Parque Municipal de Mucugê, Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: *V. seubertiana* ($12^{\circ}59'S\ 041^{\circ}20'W$), *V. punctulata* ($12^{\circ}59'S\ 041^{\circ}20'W$) e *V. jolyi* ($12^{\circ}59'S\ 041^{\circ}20'W$). Após a coleta as sementes foram retiradas das cápsulas e armazenadas em sacos de papel na geladeira com temperatura de 6 a 10°C , por três meses.

4.2.3 Germinação *in vitro*

As sementes foram lavadas em água da torneira com detergente para retirada das impurezas superficiais, e direcionadas para a câmara de fluxo laminar onde foram desinfestadas com álcool a 70 % (1') e hipoclorito a 2,5 % (10'), sendo adicionado a imersão em fungicida Bendasol (10') e aumento do tempo no hipoclorito (15') para *Vellozia punctulata* e *Vellozia seubertiana* devido à persistência de contaminação fúngica e bacteriana em ensaios preliminares.

As sementes de *Vellozia jolyi*, *Vellozia seubertiana* e *Vellozia pyrantha* foram inoculadas em frascos com 50 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas (MS/2) e para *Vellozia punctulata* utilizou-se um terço

das concentrações salinas (MS/3), conforme ensaios preliminares. A suplementação do meio de cultura foi feita com 30 g.L⁻¹ de sacarose para *V. pyrantha* e 15 g.L⁻¹ para as demais espécies, de acordo com os resultados observados no estabelecimento *in vitro* das espécies (Capítulo 2). Nos tratamentos das espécies *V. pyrantha* e *V. seubertiana* foi acrescido 1 g.L⁻¹ de carvão ativado.

4.2.4 Efeito do estresse térmico na multiplicação *in vitro*, no conteúdo relativo de água foliar (CRAf %) e de prolina

Plantas com 3 meses germinadas *in vitro* em meio MS/2 (*V. seubertiana*, *V. pyrantha* e *V. jolyi*) e MS/3 (*V. punctulata*) foram transferidas para meio de mesma composição, suplementado com 7 g.L⁻¹ de ágar em tubos vedados com PVC (Policloreto de vinila) e submetidas a estufa de secagem e esterilização com temperatura de 140 ±3 °C, regulada por um termômetro, por diferentes períodos de exposição: 0,0 (controle); 4,0; 6,0; 8,0 e 10 minutos. A temperatura de 4 tubos por tratamento foi aferida após a exposição a alta temperatura utilizando um termômetro infravermelho (modelo42515, Extech instruments) (Tabela 1).

Tabela 1 – Temperatura média dos tubos de quatro espécies de *Vellozia* após exposição a estufa de esterilização e secagem a 140 ±3 °C por diferentes períodos.

Temperatura do tubo e desvio padrão				
Tratamentos	<i>Vellozia pyrantha</i>	<i>Vellozia seubertiana</i>	<i>Vellozia punctulata</i>	<i>Vellozia jolyi</i>
4´	80,2 °C / 5,90	86,2 °C / 8,18	79,5 °C / 1,29	80,5 °C / 5,44
6´	83,5 °C / 7,32	94,2 °C / 7,63	86,5 °C / 4,04	96,0 °C / 2,16
8´	96,7 °C / 5,90	98,2 °C / 6,60	92,2 °C / 8,26	102 °C / 2,94
10´	103,2 °C / 1,70	104,7 °C / 3,59	102,5 °C / 2,08	100 °C / 7,11

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado composto por 5 tratamentos distribuídos em 7 repetições com 2 parcelas cada para *V. seubertiana* e *V. jolyi*, 11 repetições com 1 parcela para *V. pyrantha* e 10 repetições com 2 parcelas para *V. punctulata*.

A fim de realizar a determinação de conteúdo relativo de água foliar (CRAf) e a análise de prolina, o tratamento controle (0,0) e o de estresse (6 minutos) (Temp. média do

tubo 82 °C e 84,7 °C) foram repetidos. Cada tratamento foi composto de 19 repetições com 3 parcelas em *V. seubertiana* e 16 repetições com 3 parcelas em *V. pyrantha*.

4.2.5 Variáveis analisadas

Após 45 dias da montagem dos experimentos de multiplicação foram avaliados: porcentagem de sobrevivência da planta (% S), porcentagem de planta responsiva a formação de brotos (% PR), número de brotos por planta (NB), comprimento do maior broto (CMB), número de folhas (NFB), matéria seca (MSB) e número de raízes dos brotos (NRB). Amostras de 6 plantas (três folhas por indivíduo) foram retiradas em cada tratamento após 3 dias de exposição a alta temperatura e os valores foram usados na fórmula CRAf (%) = $(MFf - MSF / MTf - MSf) \times 100$ conforme descrito por Weatherley (1950), em que MFf é a massa fresca da folha, MTf a massa túrgida da folha e MSf a massa seca da folha. O conteúdo relativo de água foliar (CRAf %) foi obtido usando cada amostra como repetição.

A quantificação de prolina foi realizada utilizando o método de Bates (1973) após 3 dias de exposição a alta temperatura com a maceração de 100 mg (massa fresca) de folhas utilizando ácido sulfossalicílico 3 %.

4.2.6 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada com o teste Shapiro-Wilk utilizando o programa R Core Team, v 4.0.5 (2020). As médias obtidas com os valores das parcelas foram comparadas pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade e transformadas com a raiz quadrada de $y + 0.5 - \sqrt{y + 0.5}$ utilizando o programa SISVAR, v 5.3, desenvolvido por FERREIRA (2011). As médias da temperatura dos tubos foram obtidas de quatro tubos por tratamento e a partir desses valores retirou-se o desvio padrão utilizando o programa Excel.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efeito do estresse térmico na multiplicação *in vitro*

A porcentagem de sobrevivência da planta (% S) foi influenciada pela alta temperatura nas quatro espécies de *Vellozia* (Tabela 1 Apêndice D). As maiores % S foram observadas no tratamento controle e período de 4' em *V. jolyi* (100 %), *V. pyrantha* (100 %) e *V. seubertiana* (100 %; 92,85 %), decaindo a partir dos 6 minutos (Figura 1 A - C). *V. punctulata* teve decréscimo de (75 %) na % S a partir de 8' (Figura 1 D). As plantas de *V. pyrantha* e *V. seubertiana* não sobreviveram nos períodos de 8' (Figura 1 A e B), e apenas *V. punctulata* teve plantas sobreviventes no período de 10' minutos (10 %) (Figura 1 D).

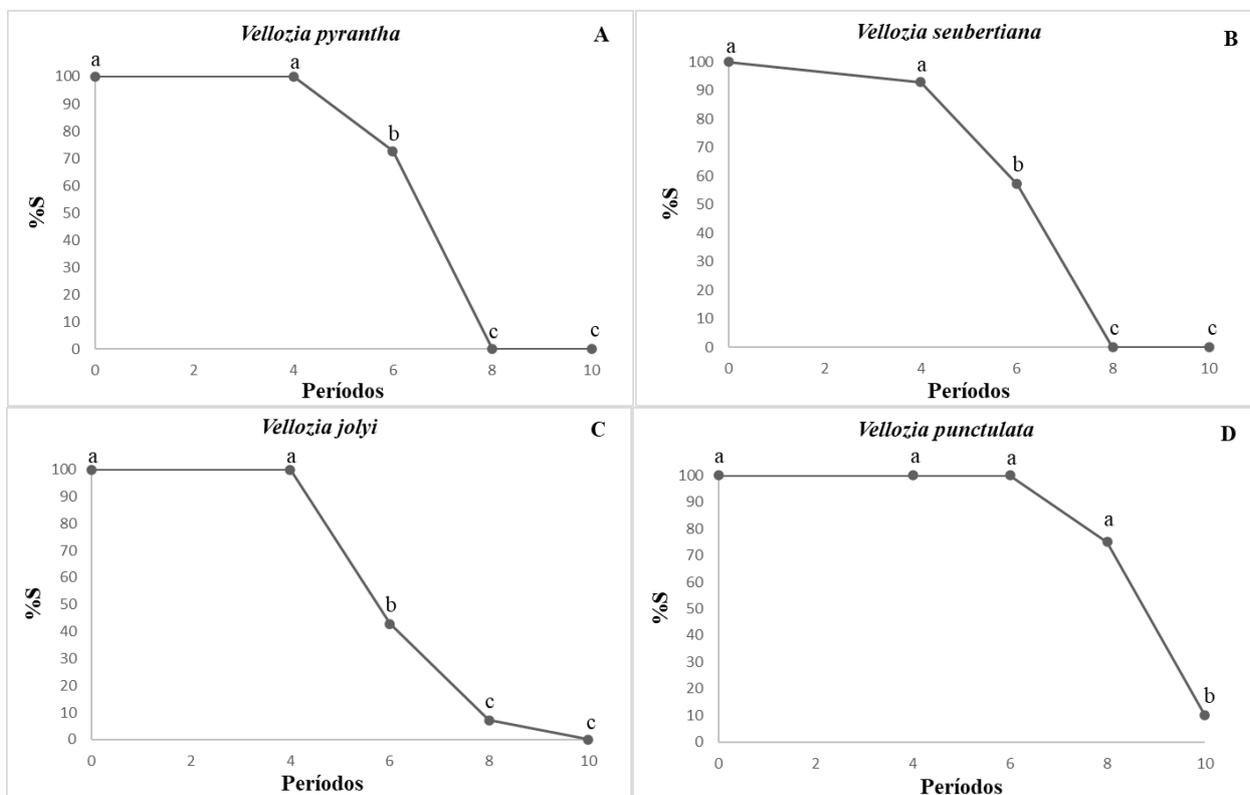


Figura 1 – Porcentagem de sobrevivência (% S) de quatro espécies do gênero *Vellozia* submetidas a alta temperatura (140 ± 3 °C) por diferentes períodos (minutos) e controle 0,0 (sem exposição), aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

A alta temperatura induziu a reprodução vegetativa em três das quatro espécies de *Vellozia*. Nos tratamentos de *V. punctulata* houve resposta singular a alta temperatura com interferência positiva ($P \leq 0,05$) na maioria das variáveis estudadas (Tabela 2 Apêndice D). *V. punctulata* apresentou maiores médias de plantas responsivas (% PR) número de broto (NB),

comprimento do maior broto (CMB), número de folhas (NFB), e matéria seca do broto (MSB) no período 8 minutos (Figura 2).

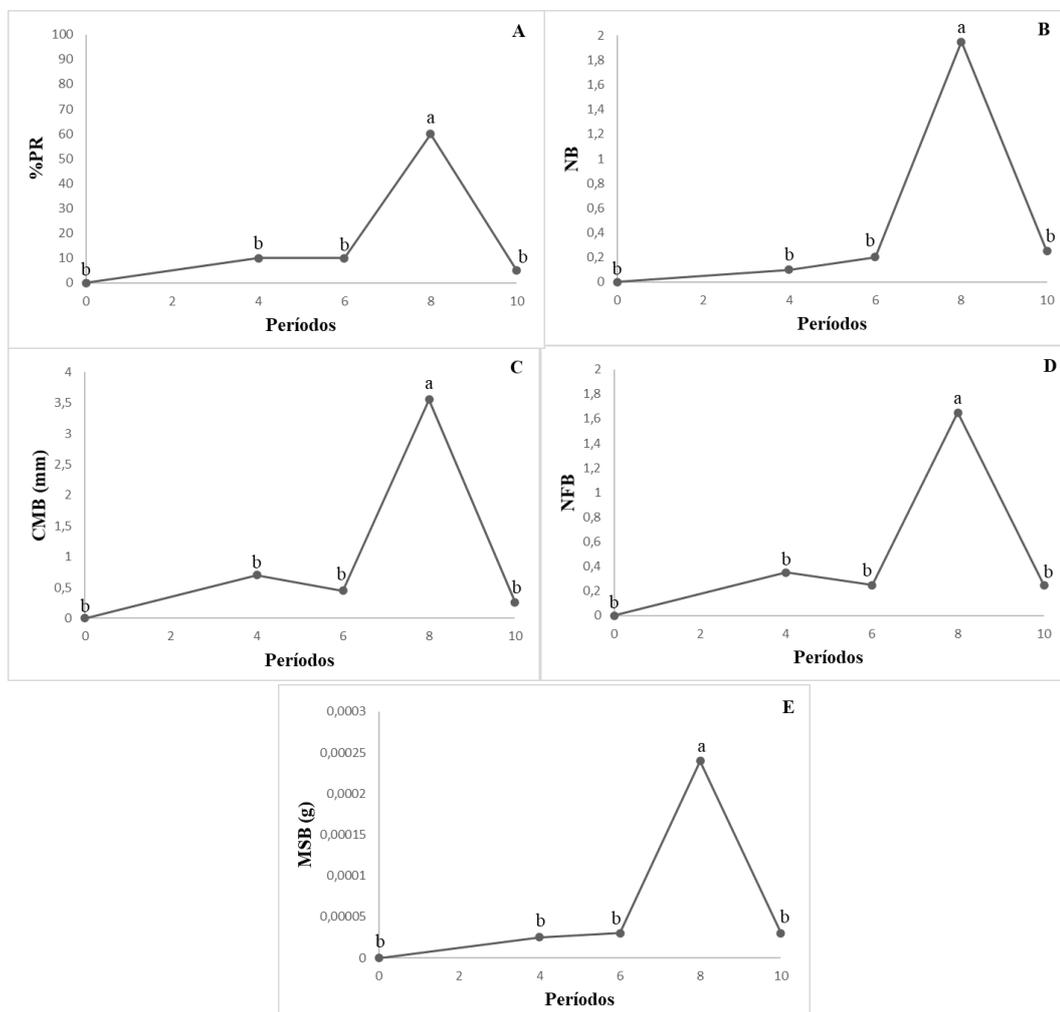


Figura 2 – Número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CMB), número de folhas do broto (NFB), porcentagem de plantas responsivas (% PR), matéria seca do broto (MSB) de *Vellozia punctulata* submetida a alta temperatura 140 ± 3 °C por diferentes períodos (minutos) e controle 0' (sem exposição) aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

A mesma espécie emitiu brotos em todos os períodos de exposição a alta temperatura, exceto no controle (Figura 3 A). Nos tratamentos com a alta temperatura em *V. punctulata* só foi observado sinal visual marcante de estresse, como folhas secas culminando na morte da planta no maior período avaliado (10') (Figura 3 E). Nas demais espécies observou-se visualmente a perda de clorofila a partir de 6' em *V. jolyi* (Figura 3 I e J), e aos 4' em *V. pyrantha* e (Figura 3 N e O) *V. seubertiana* (Figura 3 S e T).

A exposição a 6 e 10 minutos de alta temperatura induziu 2 brotos e 1 broto respectivamente em *V. jolyi*, nos ensaios com *V. pyrantha* contactou-se 5 brotos aos 4 minutos de estresse térmico, enquanto na espécie *V. seubertiana* não foi observado indução de reprodução vegetativa em nenhum dos períodos testados (Figura 3).

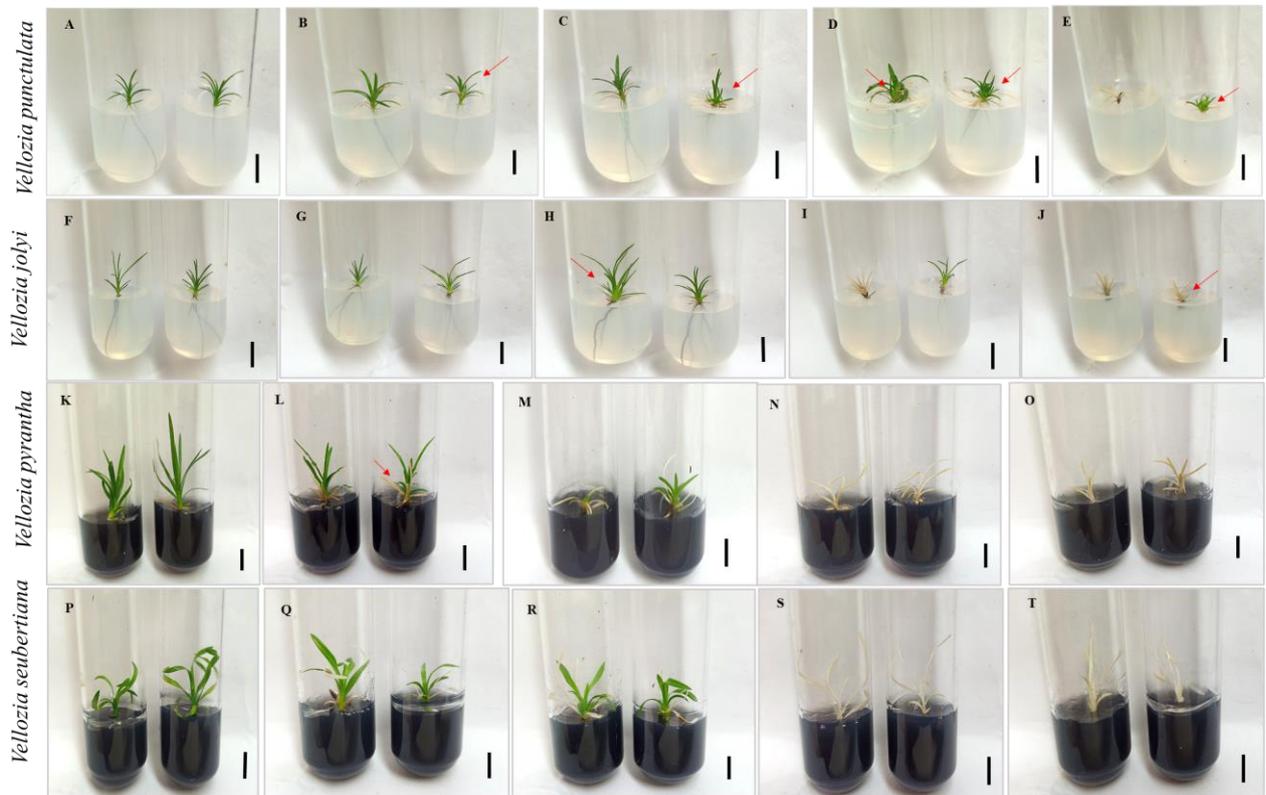


Figura 3 – Quatro espécies do gênero *Vellozia* submetidas a alta temperatura 140 ± 3 °C em diferentes períodos 0' (Controle - sem exposição) (A, F, K e P), 4' (B, G, L e Q), 6' (C, H, M e R), 8' (D, I, N e S), 10' (E, J, O e T) aos 45 dias. Seta – Indica brotos. Escala da barra = 1 cm.

A quantificação de prolina não mostrou diferença para nenhuma das espécies estudadas (Tabela 3 Apêndice D), apresentando médias de 7,15 (controle) e 4,75 (6 minutos) em *V. seubertiana* e 3,44 (controle) e 3,15 (6 minutos) em *V. punctulata*.

Em relação ao conteúdo relativo de água foliar (CRAf %) foi observado interferência na porcentagem hídrica de *V. pyrantha*, já em *V. seubertiana* não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4 Apêndice D). O CRAf % decaiu em *V. pyrantha* após 3 dias de exposição a alta temperatura (Tabela 2).

Tabela 2 - Conteúdo relativo de água foliar (CRAf %) de duas espécies do gênero *Vellozia* 3 dias após exposição a alta temperatura.

Temperatura (140 ±3°C)	<i>Vellozia pyrantha</i>	<i>Vellozia seubertiana</i>
Controle	79,34 a	81,61 a
6 minutos	45,97 b	85,16 a

Médias com mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1 Efeito do estresse térmico na multiplicação *in vitro*

A elevada % S de *Vellozia* após exposição a alta temperatura ($140 \pm 3^\circ\text{C}$) por 6` (Temp. do tubo *V. pyrantha* $83,5^\circ\text{C}$; *V. seubertiana* $94,2^\circ\text{C}$; *V. jolyi* $96,0^\circ\text{C}$) e 8` (Temp. do tubo *V. punctulata* $92,2^\circ\text{C}$) é surpreendente, considerando que a temperatura limite para tecidos vivos geralmente é de 60°C ou acima de 50°C com exposição prolongada, as quais culminariam em rápida desnaturação das proteínas (DIOS, 2020). Esses resultados indicam resistência fora do comum a alta temperatura.

As mortalidades nos períodos 8 e 10 minutos de *V. pyrantha* (Temp. média do tubo $96,7^\circ\text{C}$ / $98,2^\circ\text{C}$) e *V. seubertiana* (Temp. média do tubo $103,2^\circ\text{C}$ / $104,7^\circ\text{C}$) sinalizam seus limites de resistência a alta temperatura e destaca a influência do tempo de exposição na resposta e capacidade de recuperação após o estresse. Essas espécies em habitat natural apresentam proteção do meristema vegetal por adaptações como maior espessura da casca, bainhas foliares e gemas subterrâneas (CLARKE et al., 2013; CHARLES-DOMINIQUE et al., 2015; DIOS, 2020), o que reduz a temperatura interna em relação ao exterior vegetal (COUTINHO, 1990; DIOS, 2020), que, em um incêndio, pode variar de 33°C a 442°C considerando a faixa de 1 cm a 50 cm acima do solo como constatado em experimento de incêndio controlado no Cerrado (SCHMIDT et al., 2017), e nos intervalos de 121°C a 149°C / 204°C a 316°C na superfície do solo de duas áreas do campo rupestre no Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia (CONCEIÇÃO et al., 2017).

Em relação a *V. jolyi* e *V. punctulata* a tolerância a dessecação pode estar relacionada a resposta diferenciada à exposição a alta temperatura, pois essas espécies estão inseridas em cenário peculiar com combinação de condições estressantes, alta incidência solar no ambiente rupícola e incêndios recorrentes em habitat contínuo, que proporciona contato com outra forma de elevação da temperatura do ar e provavelmente potencializa o desenvolvimento de resistência dessas espécies.

A indução de brotos de *V. pyrantha*, *V. punctulata* e *V. jolyi* após exposição a alta temperatura chama a atenção para o papel que estresses abióticos podem ter como impulsionadores de rebrota e recuperação no campo rupestre. A resposta de *V. punctulata* para número de brotos (1,95) com a alta temperatura é similar ao resultado obtido em *V. pyrantha*

utilizando outro tipo de estresse térmico (fogo) como gatilho para reprodução vegetativa (BORGES et al., 2020).

O decréscimo no número de brotos em *V. punctulata* no maior período (10`) de exposição a alta temperatura pode ser associado ao aumento de mortalidade e a perda de vigor das plantas, observado pela redução de área foliar da planta mãe e através do decréscimo no comprimento (CMB), número de folhas (NFB) e matéria seca (MSB) dos brotos, contrastando com as maiores médias obtidas para essas variáveis na exposição por 8 minutos (Figura 3 D e E).

A redução considerável de CRAf % em *V. pyrantha* após exposição ao estresse térmico por 6 minutos de exposição a alta temperatura não teve impacto expressivo na sua sobrevivência, que se manteve acima de 70 %, resposta que sugere certo nível de resistência a baixa disponibilidade hídrica, situação semelhante a encontrada nas secas sazonais e nos incêndios em campo rupestre que intensificam a perda hídrica durante e após a passagem do fogo (MIDGLEY et al., 2011; SILVEIRA et al., 2016). Esperava-se que a resposta de perda hídrica ocorresse concomitante ao aumento no conteúdo de prolina, diante de sua ação protetora contra subprodutos tóxicos e como reserva para restauração de homeostase celular nos vegetais expostos a estresses abióticos (WAHID et al., 2007; TAIZ et al., 2017). A ausência de alteração desse aminoácido permite supor a ativação de outras vias fisiológicas na produção de osmoprotetores como açúcares, açúcares álcoois e glicina betaína (TAIZ et al., 2017).

4.5. CONCLUSÃO

V. seubertiana, *V. pyrantha*, *V. punctulata* e *V. jolyi* são resistentes a alta temperatura. *V. punctulata* teve maior resiliência entre as demais espécies estudadas devido a manutenção do seu potencial na indução de brotos, sendo seu limite térmico aos 8` de exposição (Temp. do tubo 92,2 °C). A alta temperatura foi eficiente para indução de reprodução vegetativa *in vitro* em *V. punctulata*.

As evidências indicam que a prolina não é utilizada na osmoproteção contra a alta temperatura em *V. seubertiana* e *V. pyrantha*. As quatro espécies de *Vellozia* podem ser usadas em futuros trabalhos sobre mecanismos de proteção à alta temperatura, como os relacionados a ausência de desnaturação proteica e outras vias de proteção bioquímica.

4.6 REFERÊNCIAS

- ALEEM, S. et al. Heat tolerance in vegetables in the current genomic era: an overview. **Plant Growth Regulation**, v. 92, p. 497-516, 2020.
- BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.
- BARTELS, D.; SALAMINI, F. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. **Plant Physiology**, v. 127, p.1346-1353, 2001.
- BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Plant Science**, v. 4, p. 1-18, 2013.
- BORGES, B. P. S. Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 709-713, 2020.
- COUTINHO, L. M. Fire in the Ecology of the Brazilian Cerrado. In: GOLDAMMER J. G. (eds). **Fire in the Tropical Biota**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1990. p. 82-105.
- COUTINHO, M. L. O bioma Cerrado. In: Aldo L. K. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, 2002. p. 68-82.
- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica**, v. 23, p. 85-111, 2005.
- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R.; MEIRELLES, S. T. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of “Chapada Diamantina”, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 641-656, 2007.
- CONCEIÇÃO, A. A.; SOUZA, J. M.; SILVA, G. A.; BRITO, J. C.; PELACANI, C. R.; OLIVEIRA, R. C. S.; MOREIRA, F. G.; JESUS, L. B. L.; CRISTO, F. H.; SAMPAIO, A. B.; LINTOMEN, B. S.; GONÇALVES, C. N.; SCHMIDT, I. B. Uso, manejo e conservação de duas espécies endêmicas sob pressão de coleta e impactos do fogo no Parque Nacional da Chapada Diamantina, Nordeste do Brasil. In: MANTOVANI, W.; MONTEIRO, R. F.; ANJOS, L.; CARIELLO, M. O. (Eds.), *Pesquisas em unidades de conservação no domínio da caatinga: subsídios à gestão*. 2017 p. 247-262.
- CHARLES-DOMINIQUE, T et al. Bud protection: a key trait for species sorting in a forest–savanna mosaic. **New Phytologist**, v. 207, p.1052-1060, 2015.
- CLARKE, P. J. et al. Resprouting as a key functional trait: how buds, protection and resources drive persistence after Fire. **New Phytologist**, v. 197, p. 19-35, 2013.
- DJILIANOV, D. et al. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, p. 115-118, 2005.

DIOS, V. R. Effects of Fire on Plant Performance. In: _____ **Plant-Fire Interactions Applying Ecophysiology to Wildfire Management**. Springer Nature Switzerland, 2020. p. 117-175.

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

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERC, G. J. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Netherlands, Springer, 2008. p. 29-64.

KAPPEN, V. L. Der Einfluß des Wassergehaltes auf die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegenüber hohen und tiefen Temperaturen, untersucht an Blättern einiger Farne und von *Ramonda myconi*, **Flora oder Allgemeine botanische Zeitung. Abt. A, Physiologie und Biochemie**. v. 156, p 427-445, 1966.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups**. 4th ed. Berlin: Springer, 2003. 513. p

MELLO-SILVA, R. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Velloziaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 259-262, 2018.

MELLO-SILVA, R. Velloziaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

MIDGLEY, J. J. et al. How do fires kill plants? The hydraulic death hypothesis and Cape Proteaceae “fire-resisters”. **South African Journal of Botany**, v. 77, p. 381-386, 2011.

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

NEVES, S. P. S. **Fenologia biologia floral e polinização de espécies de Velloziaceae Endl. em área de campo rupestre na Chapada Diamantina**. Bahia. Brasil. 2009. 67f. Mestrado (Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

POREMBSKI, A.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as center of diversity desiccation-tolerant vascular plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 19-28, 2000.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020.

SILVEIRA, F, A. O. et al. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant and Soil**, v. 403, p.129-152, 2016.

SCHMIDT, I. B. et al. How do the wets burn? Fire behavior and intensity in wet grasslands in the Brazilian savana. **Brazilian Journal of Botany**, v. 40, p.167-175, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, R. E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. sixth ed. Artmed, Porto Alegre. 2017, 888.p

TIWARI, S. et al. Regulation of temperature stress in plants. In: TRIPATHI D. K.; CHAHAN, D. K.; PRASAD, S. M.; RAMAWAT, N.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; DUBEY, N. K. **Plant Life under Changing Environment Responses and Management**. Elsevier Inc. 2020. p. 25-45.

VIEWEG, G.; ZIEGLER, H. Zur Physiologie von *Myrothamnus flabellifolia*. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 82, 29-36, 1969.

WAHID, A. et al. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199-223, 2007.

WEATHERLEY, P. E. Studies in the water relations of the cotton plant. **New Phytologist**, v. 89, p. 81-97, 1950.

CONCLUSÃO GERAL

O fogo e a seca têm marcante influência na seleção de traços morfofuncionais das seis espécies de *Vellozia* estudadas. A distinção em dois grupos relacionados às características de espécies de ambiente contínuo (fogo) e afloramento rochoso (seca) sugere *tradeoff* entre esses estresses abióticos, ou seja, alta adaptação a um deles, mas não a ambos. *V. seubertiana* e *V. pyrantha* são resilientes à ação do fogo e têm admirável capacidade regenerativa após incêndios com a reconstituição do órgão foliar. O maior potencial de reprodução vegetativa observada em *V. seubertiana* pode estar relacionado ao seu tipo de rebrota epicormica, enquanto em *V. pyrantha* prevalece a do tipo apical.

Os crescimentos iniciais *in vitro* de *V. punctulata*, *V. jolyi*, *V. sincorana* e *V. seubertiana* correspondem a pobreza nutricional do campo rupestre, apresentando resultado positivo em meio de cultura MS com concentração salina reduzida acrescido de 15 g.L⁻¹ de sacarose. O estresse hídrico e térmico foram gatilhos eficientes para a multiplicação *in vitro* de *Vellozia*. As evidências indicam a prolina como um dos osmoprotetores em Velloziaceae em estresse hídrico.

V. punctulata, *V. jolyi*, *V. seubertiana* e *V. pyrantha* apresentaram resistência ao estresse hídrico e térmico, mostrando-se boas candidatas para futuras pesquisas relacionadas a fisiologia, bioquímica, resposta hormonal, além de proteínas e genes relacionados a esses estresses.

APÊNDICE A

Capítulo I – Atributos morfofuncionais em espécies de *Vellozia* sob fogo e seca

Tabela 1 - Resumo da análise de componentes principais (CPA), de seis espécies do gênero *Vellozia* da Chapada Diamantina, Bahia, baseado nos traços funcionais altura do indivíduo (AL), diâmetro da roseta (DR) e área foliar (AF).

Parâmetros	*CP1 (70 %)	CP2 (22 %)	CP3 (7,6 %)
Altura	0,49812	0,83511	0,23338
Diâmetro da roseta	0,58925	-0,52346	0,61545
Area foliar	0,63613	-0,16905	-0,75284

*CP – Componente Principal

Tabela 2 - Teste de Kruskal-Wallis para profundidade da gema (PG) de seis espécies do gênero *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo) e afloramento rochoso (seca).

FV	PG
Tratamento	2,871E-06**
H (chi2)	21,77

**altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 3 – Análise de Dunn para profundidade da gema (PG) de seis espécies do gênero *Vellozia* de ambiente contínuo (fogo) e afloramento rochoso (seca).

Tratamento	PG
Seca	-----
Fogo	2,871E-06**

**altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Dunn.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para altura do indivíduo (AL), diâmetro da roseta (DR) e área foliar (AF) entre seis espécies do gênero *Vellozia* da Chapada Diamantina, Bahia.

Quadrados Médios				
FV	GL	AL	DR	AF
Espécies	5	26509,084167**	8,986645**	5,12047691**
Resíduo	54			
CV%		24,53	15,30	35,95

**altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. Dados de DR transformados y + 1.0 - sqrt (y + 1.0).

Tabela 5 - Teste de Kruskal-Wallis para profundidade da gema (PG) entre seis espécies do gênero *Vellozia* da Chapada Diamantina, Bahia.

FV	PG
Espécies	4,451e-05**
H (chi2)	27,39

**altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 6 – Análise de Dunn para profundidade da gema (PG) entre seis espécies do gênero *Vellozia* da Chapada Diamantina, Bahia.

Espécies	<i>Vellozia punctulata</i>	<i>Vellozia jolyi</i>	<i>Vellozia hemisphaerica</i>	<i>Vellozia pyrantha</i>	<i>Vellozia sincorana</i>	<i>Vellozia seubertiana</i>
<i>Vellozia punctulata</i>	----	0,0806	0,3397	0,1214	0,249	0,006894**
<i>Vellozia jolyi</i>	0,0806	----	0,428	0,0009796**	0,003731**	8,622E-06**
<i>Vellozia hemisphaerica</i>	0,3397	0,428	----	0,01229**	0,03508	0,0002556**
<i>Vellozia pyrantha</i>	0,1214	0,0009796**	0,01229**	----	0,6919	0,249
<i>Vellozia sincorana</i>	0,249	0,003731**	0,03508**	0,6919	----	0,1214
<i>Vellozia seubertiana</i>	0,006894**	8,622E-06**	0,0002556**	0,249	0,1214	----

**altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Dunn.

Influência do fogo na capacidade reprodutiva e regeneração de duas espécies de *Vellozia*

Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis para número de rosetas regeneradas (NRR) e número de rosetas novas (NRN) de duas espécies do gênero *Vellozia* 50 dias após incêndio no campo rupestre.

FV	NRR	NRN
Espécies	0,08717	0,001238**
H (chi2)	2,893	8,691

**altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 8 – Análise de Dunn`pos hot para número de rosetas novas (NRN) de duas espécies do gênero *Vellozia* 50 dias após incêndio no campo rupestre.

FV	NRN
<i>Vellozia seubertiana</i>	----
<i>Vellozia pyrantha</i>	0,001238**

**altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Dunn.

APÊNDICE B

Capítulo II – Crescimento inicial *in vitro* de espécies de *Vellozia* da Chapada

Diamantina

Tabela 1– Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de *Vellozia seubertiana* e *Vellozia sincorana* submetida a diferentes concentrações de meio de cultura, sacarose e carvão.

FV	GL	Porcentagem de germinação	
		<i>Vellozia seubertiana</i>	<i>Vellozia sincorana</i>
Meio	1	0,006023 ^{ns}	0,142790 ^{ns}
Sacarose	2	0,001320 ^{ns}	1,109479**
Carvão	1	0,021121 ^{ns}	0,205618 ^{ns}
Meio*Sacarose	2	0,148238**	40,095669 ^{ns}
Meio*Carvão	1	0,101232 ^{ns}	0,005712 ^{ns}
Meio*Sacarose*Carvão	2	0,144536**	0,129939 ^{ns}
Resíduo	50/38		
CV%		13,02	20,98

^{ns} Não significativo; ** altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey e ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de *Vellozia punctulata* e *Vellozia jolyi* submetidas a diferentes concentrações de meio de cultura e sacarose.

FV	GL	Porcentagem de germinação	
		<i>Vellozia punctulata</i>	<i>Vellozia jolyi</i>
Meio	1	0,575638 ^{ns}	0,230288 ^{ns}
Sacarose	2	0,089299 ^{ns}	0,003170 ^{ns}
Meio*Sacarose	2	0,310391 ^{ns}	0,172782 ^{ns}
Resíduo	30		
CV%		35,05	26,22

^{ns} Não significativo ao nível 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e porcentagem de microplanta com raiz (%MR) de *Vellozia seubertiana* submetida a diferentes concentrações de meio de cultura, sacarose e carvão ativado.

FV	GL	Quadrados Médios				
		NF	CPA	MSPA	MSR	%MR
Meio	1	1,768245 ^{ns}	0,035260 ^{ns}	0,000007**	5,56981317 ^{ns}	0,021668 ^{ns}
Sacarose	2	18,898175**	107,538050**	0,000005**	7,67823433*	0,229125 ^{ns}
Carvão	1	0,081115 ^{ns}	739,500336**	0,000001 ^{ns}	3,25584334 ^{ns}	0,001438 ^{ns}
Meio*Sacarose	2	14,921439**	98,067494**	0,000005**	3,34508120 ^{ns}	0,384407 ^{ns}
Meio*Carvão	1	1,384263 ^{ns}	14,493130 ^{ns}	1,16269135 ^{ns}	5,59925341 ^{ns}	0,000795 ^{ns}
Meio*Sacarose*Carvão	2	0,208383 ^{ns}	8,766058 ^{ns}	1,54485802 ^{ns}	2,05139522 ^{ns}	0,022483 ^{ns}
Resíduo	62					
CV%		26,51	29,54	38,32	0,01	33,02

^{ns} Não significativo; *significativo ao nível de 5% de probabilidade e ** altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Tukey. Variável MSR transformadas $(x+1)^{1/2}$.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e porcentagem de microplanta com raiz (%MR) de *Vellozia sincorana* submetida a diferentes concentrações de meio de cultura, sacarose e carvão ativado.

FV	GL	Quadrados Médios				
		NF	CPA	MSPA	MSR	%MR
Meio	1	0,520833 ^{ns}	0,000175 ^{ns}	4,76672454 ^{ns}	1,05468750 ^{ns}	0,078273 ^{ns}
Sacarose	2	17,040075 ^{**}	92,193725 ^{**}	3,60817419 ^{ns}	2,05665509 ^{ns}	0,316178 [*]
Carvão	1	0,113426 ^{ns}	447,486356 ^{**}	2,55208333 ^{ns}	1,91689815 ^{ns}	0,016544 ^{ns}
Meio*Sacarose	2	2,488281 ^{ns}	33,656685 ^{ns}	1,98603877 ^{ns}	7,59027778 ^{ns}	0,001231 ^{ns}
Meio*Carvão	1	1,171875 ^{ns}	0,739620 ^{ns}	2,52083333 ^{ns}	4,38020833 ^{ns}	0,041697 ^{ns}
Meio*Sacarose*Carvão	2	1,136719 ^{ns}	0,771972 ^{ns}	0,000001 ^{ns}	6,46527778 ^{ns}	0,054242 ^{ns}
Resíduo	38					
CV%		16,13	21,94	24,59	66,06	15,92

^{ns} Não significativo, ^{**} altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e porcentagem de microplanta com raiz (%MR) de *Vellozia jolyi* submetida a diferentes concentrações de meio de cultura e sacarose aos 120 dias.

FV	GL	Quadrados Médios				
		NF	CPA	MSPA	MSR	%MR
Meio	1	50,884444 ^{**}	58,119023 ^{**}	0,000001 ^{**}	9,60400000 ^{**}	0,574921 ^{**}
Sacarose	2	18,207778 ^{**}	28,720615 [*]	2,47777778 ^{ns}	7,55444444 ^{ns}	0,379643 ^{**}
Meio*Sacarose	2	20,134444 ^{**}	22,063859 [*]	4,04133333 ^{ns}	2,67233333 ^{ns}	0,237366 [*]
Resíduo	30					
CV%		33,53	45,78	50,09	53,32	27,45

^{ns} Não significativo; ^{*} significativo ao nível de 5% de probabilidade e ^{**} altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tabela 6 – Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca das raízes (MSR) e porcentagem de microplanta com raiz (%MR) de *Vellozia punctulata* submetida a diferentes concentrações de meio de cultura e sacarose aos 120 dias.

FV	GL	Quadrados Médios				
		NF	CPA	MSPA	MSR	%MR
Meio	1	0,602200 [*]	1,753549 ^{**}	1,72939203 ^{ns}	3,92109175 ^{ns}	0,789865 ^{**}
Sacarose (S)	2	0,647126 ^{**}	0,572740 ^{**}	0,000002 ^{**}	7,43378244 ^{**}	0,062696 ^{ns}
Meio*S	2	0,380679 ^{ns}	0,767881 ^{**}	1,82493778 ^{ns}	4,87216321 ^{ns}	0,074650 ^{ns}
Resíduo	30					
CV%		10,65	10,60	0,03	0,02	20,36

^{ns} Não significativo; ^{*} significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste; ^{**} altamente significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Dados transformados $(x+1)^{1/2}$.

APÊNDICE C

Capítulo III - Estresse hídrico como indutor de multiplicação *in vitro* de quatro espécies de *Vellozia* da Chapada Diamantina

Efeito do estresse hídrico sacarose e manitol na multiplicação *in vitro*.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para porcentagem de planta responsiva a formação de brotos (% PR), número de brotos por explantes (NB), comprimento do maior broto (CMB), número de folhas (NF), matéria seca (MS), número de raiz (NR) e sobrevivência da planta (% S) de quatro espécies do gênero *Vellozia* submetida a diferentes concentrações de sacarose combinada com manitol, aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

		Quadrados Médios						
		% S	% PR	NB	CMB	NF	MS	NR
		<i>Vellozia pyrantha</i>						
FV	GL							
Trat.	4	0,01262 7 ^{ns}	0,412217 **	0,268541 *	0,79182 7*	0,26213 3**	8,70727081E -0008 ^{ns}	0,01910 7 ^{ns}
Resíduo	25							
CV%		7,25	80,47	28,78	41,44	25,01	0,03	21,29
		<i>Vellozia seubertiana</i>						
FV	GL							
Trat.	4	0,10733 1*	0,107331 ns	0,020851 ns	0,54416 1 ^{ns}	0,17956 6 ^{ns}	1,69035281E -0007 ^{ns}	0,01740 5 ^{ns}
Resíduo	25							
CV%		12,63	191,49	13,99	56,74	37,04	0,05	12,72
		<i>Vellozia punctulata</i>						
FV	GL							
Trat.	4	416,666 667 ^{ns}	625,0000 00 ^{ns}	0,165010 ns	0,05172 5 ^{ns}	0,74704 7 ^{ns}	3,09608417E -0007 ^{ns}	0,18427 5 ^{ns}
Resíduo	25							
CV%		20,41	93,47	33,11	19,58	46,22	0,06	40,54
		<i>Vellozia jolyi</i>						
FV	GL							
Trat.	4	333,333 333 ^{ns}	916,6666 67 ^{ns}	0,251026 ns	0,01463 5 ^{ns}	0,46197 1 ^{ns}	7,06909771E -0008 ^{ns}	0,13391 2 ^{ns}
Resíduo	25							
CV%		15,49	129,90	44,24	20,47	51,99	0,04	31,74

^{ns} Não significativo; *significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott, ** altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Scott Knott. Dados transformados (NB, CMB, NF, MS e NR) raiz quadrada de $y + 0,5 - \sqrt{y + 0,5}$ Trat. = Tratamento.

Efeito do estresse hídrico com PEG na multiplicação *in vitro*, no conteúdo relativo de água foliar (CRAf) e de prolina

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para sobrevivência da planta (% S) de quatro espécies do gênero *Vellozia* submetida a diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG) aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Quadrados Médios						
% S						
FV	GL	<i>Vellozia pyrantha</i>	<i>Vellozia seubertiana</i>	FV	<i>Vellozia punctulata</i>	<i>Vellozia jolyi</i>
Tratamentos	3	14328,703704**	6365,740741**	2	4333,333333*	24333,333333**
Resíduo	32					
CV%		55,47	49,74	29	41,95	38,73

** altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; *significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para conteúdo de prolina de duas espécies do gênero *Vellozia* submetida após 10 dias de cultivo *in vitro* em alta concentração de polietilenoglicol (PEG₆₀₀₀).

Quadrados Médios				
Conteúdo de prolina				
FV	GL	<i>Vellozia pyrantha</i>	GL	<i>Vellozia seubertiana</i>
Tratamentos	1	66,266163*	1	3,405857 ^{ns}
Resíduo	4		6	
CV%		19,37		15,28

^{ns} Não significativo; *significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Tabela 4 – Resumo da análise de variância para conteúdo relativo de água foliar (CRAf %) de três espécies do gênero *Vellozia* após 10 dias de cultivo *in vitro* em alta concentração de polietilenoglicol (PEG₆₀₀₀).

Quadrados Médios					
CRAf %					
FV	GL	<i>Vellozia pyrantha</i>	<i>Vellozia seubertiana</i>	GL	<i>Vellozia punctulata</i>
Tratamentos	1	430,534591*	1798,576400**	1	51,700997 ^{ns}
Resíduo	10			6	
CV%		13,10	15,94		17,12

^{ns} Não significativo; *significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott; ** altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

APÊNDICE D

Capítulo IV – Impacto do estresse térmico na multiplicação *in vitro* e bioquímica em quatro espécies de *Vellozia* da Chapada Diamantina

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para sobrevivência da planta (% S) de quatro espécies do gênero *Vellozia* submetida a diferentes períodos de exposição a alta temperatura ($140 \pm 3^\circ\text{C}$) aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

<i>Vellozia pyrantha</i>		Quadrados Médios
FV	GL	%S
Tratamentos	4	28636,363636**
Resíduo	50	
CV%		38,30
<i>Vellozia seubertiana</i>		
Tratamentos	4	16428,571429**
Resíduo	30	
CV%		35,19
<i>Vellozia jolyi</i>		
Tratamentos	4	16428,71429**
Resíduo	30	
CV%		43,64
<i>Vellozia punctulata</i>		
Tratamentos	4	15200,000000**
Resíduo	45	
CV%		23,91

^{ns} Não significativo; ** altamente significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para número de brotos por explantes (NB), comprimento do maior broto (CMB), número de folhas (NF), matéria seca (MS), número de raiz (NR) e porcentagem de planta responsiva a formação de brotos (%PR) de *Vellozia punctulata* submetida a alta temperatura ($140 \pm 3^\circ\text{C}$), aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Quadrados Médios							
FV	GL	NB	CMB	NF	MS	NR	%PR
Período	4	1,065143*	2,433357	0,761896*	4,8608061	0,017076 ^{ns}	70,909587
		*	**	*	5E-0008**		**
Resíduo	45						
CV%		31,19	41,39	34,62	0,01	16,76	85,25

^{ns} Não significativo; ** altamente significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. Dados transformados (NB, CMB, NFB, MSB e NRB) raiz quadrada de $y + 0.5 - \sqrt{y + 0.5}$.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para quantificação de prolina de duas espécies de *Vellozia* submetida a alta temperatura ($140 \pm 3^\circ\text{C}$) por 6 minutos, 3 dias após a exposição.

<i>Vellozia pyrantha</i>		Quadrados Médios
FV	GL	%S
Tratamentos	1	0,164843 ^{ns}
Resíduo	6	
CV%		20,68
<i>Vellozia seubertiana</i>		
Tratamentos	1	11,530868 ^{ns}
Resíduo	6	
CV%		51,52

^{ns} Não significativo pelo teste Scott Knott.

Tabela 4 – Resumo da análise de variância do conteúdo relativo de água foliar (CRAf %) de duas espécies de *Vellozia* submetidas a alta temperatura ($140 \pm 3^\circ\text{C}$) por 6 minutos, 3 dias após a exposição.

<i>Vellozia pyrantha</i>		Quadrados Médios
FV	GL	%S
Tratamentos	1	3341,843152*
Resíduo	10	
CV%		29,87
<i>Vellozia seubertiana</i>		
Tratamentos	1	37,721424 ^{ns}
Resíduo	10	
CV%		4,81

^{ns} Não significativo; *significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.