

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

VIRGÍNIA FERNANDES BRAGA

ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Pitcairnia albiflos*
HERB. (BROMELIACEAE) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO
E SOB ESTRESSE HÍDRICO

JUIZ DE FORA

MINAS GERAIS - BRASIL

2011

VIRGÍNIA FERNANDES BRAGA

ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Pitcairnia albiflos*
HERB. (BROMELIACEAE) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO
E SOB ESTRESSE HÍDRICO

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto

JUIZ DE FORA
MINAS GERAIS - BRASIL

2011

Braga, Virgínia Fernandes.

Estresse oxidativo em plantas micropropagadas de *pitcairnia albiflos* herb. (bromeliaceae) durante a aclimatização e sob estresse hídrico / Virgínia Fernandes Braga. – 2011.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Ecologia. 2. Aclimatização. 3. Estresse oxidativo. 4. Catalase I.
Título.

CDU 574

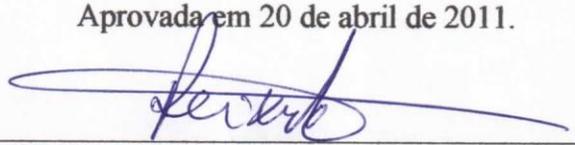
***ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE PITCAIRNIA
ALBIFLOS HERB. (BROMELIACEAE) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO E SOB
ESTRESSE HÍDRICO.***

Virgínia Fernandes Braga

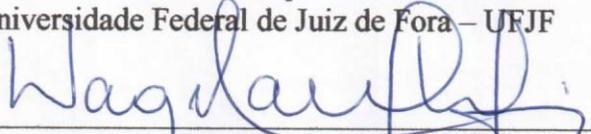
Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

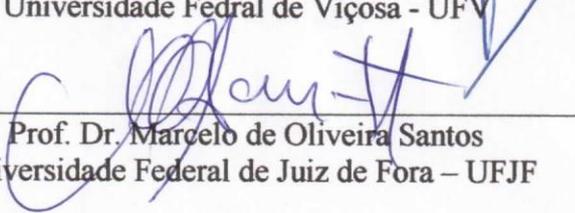
Aprovada em 20 de abril de 2011.



Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Prof. Dr. Wagner Campos Otoni
Universidade Federal de Viçosa - UFV



Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus pela oportunidade.

À Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF pela possibilidade de dar continuidade ao meu crescimento intelectual e profissional.

Ao curso de Pós-Graduação em Ecologia - PGECOL - da UFJF pelo apoio e pelos recursos oferecidos durante o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo apoio financeiro concedido para a compra de materiais de consumo e equipamentos.

Ao Laboratório de Genética da UFJF, por contribuir com o andamento das análises laboratoriais, possibilitando a utilização de equipamento do mesmo.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto, pela paciência, pelos conselhos, orientação e amizade.

Aos colegas de curso, aos queridos colegas de laboratório, que na verdade, tornaram-se amigos; Paula, Cristiane, Cristiano, Vanessa e Ricardo, muito obrigada! Sem a ajuda e colaboração de vocês dificilmente conseguiria completar essa caminhada.

À professora Dr^a. Ana Paula Gelli de Faria e alunos do curso de Nutrição, que me possibilitaram crescer nas tarefas de ensinar e despertar interesses.

A todos os professores, funcionários e colegas, do Departamento de Botânica do ICB da UFJF.

Agradeço também, especialmente, à minha mãe, Maria Aparecida; ao meu pai, José; às minhas irmãs; ao meu querido Tiago, às minhas sobrinhas; aos meus cunhados e a todos de minha família que contribuíram de alguma forma para a conclusão dessa etapa.

E também a todos aqueles, amigos e colegas, que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu chegasse até aqui.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A família Bromeliaceae.....	1
1.2. Micropropagação	2
1.3. Aclimatização <i>ex vitro</i>	3
1.4. Estresse oxidativo durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Material vegetal	9
2.2. Análises bioquímicas	11
2.2.1. Obtenção dos extratos brutos para determinações das proteínas totais, atividades enzimáticas, conteúdos de prolina e pigmentos fotossintéticos.....	11
2.2.2. Determinação de proteínas totais	11
2.2.3. Determinação da atividade da catalase (CAT)	12
2.2.4. Determinação da atividade da peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO).....	12
2.2.5. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	12
2.2.6. Determinação do conteúdo de prolina	13
2.2.7. Composição de pigmentos fotossintéticos	13
2.2.8. Teores de carboidratos	13
2.2.8.1. Determinação do teor de sacarose	13
2.2.8.2. Determinação do teor de carboidratos solúveis totais.....	14
2.2.8.3. Determinação do teor de amido	14
2.2.8.4. Determinação do teor de açúcares redutores	15
2.3. Determinação de parâmetros morfométricos e de umidade	15
2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas	15
3. RESULTADOS	17
3.1. Análises bioquímicas das plantas mantidas <i>in vitro</i> e aclimatizadas <i>ex vitro</i> em casa de vegetação	19
3.1.1. Prolina	19
3.1.2. Enzimas do metabolismo antioxidativo (catalase, superóxido dismutase, peroxidase e polifenol oxidase)	21
3.1.3. Pigmentos.....	26

3.2. Ensaio de desidratação progressiva e de reidratação	30
3.2.1. Prolina	32
3.2.2. Enzimas do metabolismo antioxidativo (catalase, superóxido dismutase, peroxidase e polifenol oxidase)	33
3.2.3. Pigmentos.....	37
3.2.4. Carboidratos.....	41
3.2.5. Conteúdo relativo de água e succulência foliar.....	43
4. DISCUSSÃO	45
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

Pitcairnia albiflos Herb. (Bromeliaceae) atualmente se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção. Essa espécie é endêmica dos afloramentos rochosos do município do Rio de Janeiro, RJ, e vem sofrendo com o pisoteio de alpinistas, queimadas, invasão de gramíneas exóticas e extrativismo vegetal. A micropropagação pode ser utilizada como alternativa às condições de risco em que as populações dessa espécie se encontram submetidas, visando à recomposição de populações ameaçadas em ambiente natural, assim como o abastecimento do mercado consumidor. A etapa final da micropropagação é a aclimatização, período em que as plantas ficam mais susceptíveis e sofrem com o estresse oxidativo devido às mudanças nas condições ambientais. No presente trabalho foram avaliadas as atividades enzimáticas antioxidativas da CAT, SOD, POD, PPO e o conteúdo de prolina, além dos teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de *Pitcairnia albiflos* cultivados *in vitro*, em meios de cultura contendo duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹), tampas não vedadas que permitiam trocas gasosas e frascos vedados com tampas e filme plástico de PVC, que impediam a ventilação. Sob essas condições, as plantas foram cultivadas em meios contendo GA₃ ou ANA. Após o período de crescimento *in vitro*, as plantas foram transferidas para condições *ex vitro* em casa de vegetação. As análises supra-citadas e a determinação dos teores de carboidratos solúveis totais, sacarose, amido, açúcares redutores, conteúdo relativo de água e suculência também foram realizadas nas plantas previamente cultivadas *in vitro* com 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ em tubos com tampas vedadas, após submissão das mesmas a estresse hídrico durante 24, 38 ou 52 dias. Após o período de estresse hídrico, as plantas foram reidratadas durante 34 dias sob irrigação periódica em casa de vegetação. Nos tecidos cultivados *in vitro* percebeu-se o surgimento de características de hiperhidricidade nas plantas cultivadas com 15 g L⁻¹ de sacarose, GA₃ e tubos com tampas vedadas, o que foi evidenciado pelo menor acúmulo de prolina, aumento das atividades das enzimas antioxidantes e menor acúmulo de pigmentos fotossintetizantes. Na condição *ex vitro*, as plantas cultivadas anteriormente em meio de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose apresentaram maior atividade das enzimas antioxidantes não havendo, em alguns casos, diferenças significativas em comparação com a concentração mais elevada de sacarose. Nessa condição o acúmulo de prolina foi menor, o que é indicativo de maior estresse oxidativo nessas plantas durante a aclimatização. Durante o estresse hídrico houve queda na atividade de todas as enzimas estudadas, embora essa queda tenha sido mais acentuada para as plantas que inicialmente foram cultivadas com 15 g L⁻¹ de

sacarose. O acúmulo de prolina aumentou com o prolongamento do estresse hídrico, sendo maior nas plantas que foram cultivadas *in vitro* com 30 g L⁻¹ de sacarose. Não houve diferenças significativas no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e nas suas relações para nenhuma das concentrações de sacarose, exceto para os carotenóides totais, que apresentaram aumento significativo ao longo do período de estresse hídrico para as plantas previamente cultivadas com a menor concentração de sacarose. Os conteúdos de carboidratos solúveis totais e sacarose aumentaram com o prolongamento do estresse, sendo mais acentuados na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. Os conteúdos de amido, o conteúdo relativo de água e a suculência apresentaram redução com o aumento do estresse hídrico. Após a reidratação, todas as plantas mostraram capacidade de recuperação, apresentando valores próximos aos dos controles para todas as variáveis analisadas. Ressalta-se, todavia, que as plantas tratadas com 30 g L⁻¹ de sacarose tiveram melhor recuperação quando comparadas com aquelas que foram tratadas com 15 g L⁻¹ de sacarose. Em função dos resultados obtidos, é possível concluir que a concentração de sacarose utilizada *in vitro* apresenta influência no processo de aclimatização *ex vitro* e também, posteriormente, no campo, na capacidade de recuperação das plantas à seca quando elas são submetidas a estresse hídrico. As plantas cultivadas *in vitro* com 15 g L⁻¹ de sacarose se mostraram mais sensíveis à seca e, possivelmente, não sobreviveriam caso fossem transferidas dos tubos de ensaio diretamente para o campo. As plantas cultivadas *in vitro* com 30 g L⁻¹ de sacarose aparentemente eram mais resistentes ao processo de aclimatização *ex vitro*, apresentando maiores chances de sobrevivência em campo, maior tolerância à seca e maior capacidade de recuperação após períodos prolongados de estresse hídrico.

Palavras-chave: aclimatização, estresse oxidativo, Bromeliaceae, catalase, superóxido dismutase, peroxidase, polifenol oxidase, prolina, carboidratos, pigmentos fotossintetéticos, *Pitcairnia albiflos*.

ABSTRACT

Pitcairnia albiflos Herb. (Bromeliaceae) is currently in the list of endangered species. This species is endemic of the inselbergs of the city of Rio de Janeiro, RJ, and has been suffering with the mountaineer's trampling, wildfires, invasion of exotic grasses and plant extraction. The micropropagation can be used as an alternative to the risk conditions under which populations of this species are submitted, aiming at the recomposition of endangered populations in the natural environment, as well as the supply of the consumer market. The final stage of the micropropagation is the acclimatization, period in which the plants become more susceptible and suffer from oxidative stress due to the changes in the environmental conditions. In the present study it were evaluated the antioxidative enzymatic activities of CAT, SOD, POD, PPO and proline content, besides the levels of photosynthetic pigments in plants of *Pitcairnia albiflos* grown *in vitro* in culture mediums containing two sucrose concentrations (15 or 30 g L⁻¹). Part was covered with unsealed lids that allowed gas exchanges and part was kept in sealed flasks with lids and PVC plastic film, that didn't allow the ventilation. Under these conditions, the plants were cultivated in culture mediums containing GA₃ or NAA. After the *in vitro* growth period, the plants were transferred to *ex vitro* conditions at a greenhouse. The above mentioned analyses and the determination of total soluble carbohydrate levels, sucrose, starch, reducer sugars, relative water content and succulence were also performed on the plants previously grown *in vitro* with 15 or 30 g L⁻¹ of sucrose and GA₃ in tubes with sealed lids, after the submission of these to water stress during 24, 38 or 52 days. After the water stress period, the plants were rehydrated for 34 days under regular irrigation at the greenhouse. In the *in vitro* cultivated tissues it was noted the emergence of hyperhydricity characteristics in the plants grown with 15 g L⁻¹ of sucrose, GA₃ and tubes with sealed lids, which was evidenced by the lowest proline accumulation, the increased in the antioxidative enzymatic activities and the lowest accumulation of photosynthetic pigments. In the *ex vitro* condition, the plants previously grown in culture mediums containing 15 g L⁻¹ of sucrose presented larger antioxidative enzymatic activities, which did not show, in some cases, significant differences compared with the largest concentration of sucrose. In this condition, the proline accumulation was lower, which is an indicative of larger oxidative stress in these plants during acclimatization. During the water stress, there was a fall in the activity of all studied enzymes, although that fall had been more evident in the plants that were initially cultivated with 15 g L⁻¹ of sucrose. The proline accumulation increased with the extension of the water stress, being larger in the plants grown *in vitro* with 30 g L⁻¹ of sucrose. There were no

significant differences in the content of photosynthetic pigments and in their relation with any sucrose concentrations, except for total carotenoids, which significantly increased over the period of water stress for the plants previously grown with the lowest concentration of sucrose. The contents of total soluble carbohydrates and sucrose increased with the extension of the stress, being more accentuated in the 30 g L⁻¹ of sucrose concentration. The contents of starch, the relative content of water and succulence presented a reduction with the increase of water stress. After the rehydration, all plants showed recovery capacity, presenting values close to those from the control groups for all the analyzed variables. It should be noted, however, that the plants treated with 30 g L⁻¹ of sucrose had better recovery compared with those that were treated with 15 g L⁻¹ of sucrose. According to the obtained results, it is possible to conclude that the concentration of sucrose used *in vitro* presents influence on the process of *ex vitro* acclimatization and also, later in the field, in the recovery capacity of the plants to drought when they are submitted to water stress. The plants grown *in vitro* with 15 g L⁻¹ of sucrose were more sensitive to drought and, possibly, would not survive if they were transferred from the test tubes directly to the field. The plants grown *in vitro* with 30 g L⁻¹ of sucrose were apparently more resistant to the *ex vitro* acclimatization process, presenting greater survival chances in the field, larger drought tolerance and larger recovery capacity after extended periods of water stress.

Key words: acclimatization, oxidative stress, Bromeliaceae, catalase, superoxide dismutase, peroxidase, polyphenol oxidase, proline, carbohydrates, photosynthetic pigments, *Pitcairnia albiflos*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae atualmente apresenta 56 gêneros e cerca de 3300 espécies distribuídas nas subfamílias Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae (Grant e Zijlstra, 1998; Luther, 2000). Segundo Porembski e Barthlott (1999) e Jacques-Félix (2000), a família tem distribuição neotropical e apresenta-se em dois grandes centros de diversidade genética: a costa leste do Brasil, nos domínios da Floresta Atlântica, e o Escudo das Guianas. Devido ao grande número de espécies de bromélias encontradas nos ecossistemas brasileiros, cerca de 40%, o país é considerado um dos mais importantes no quesito de diversidade biológica na família (Leme, 1997).

As bromélias podem ser epífitas, rupícolas ou terrestres (Coffani-Nunes e Forzza, 2001). O caule reduzido, raízes pouco desenvolvidas, folhas adaptadas ao clima árido, a base das folhas formando um tanque que permite acúmulo de água das chuvas, a presença de tricomas que possibilitam absorção de água e nutrientes e também o metabolismo fotossintético MAC (metabolismo ácido das crassuláceas), tornam as bromélias adaptadas a ambientes adversos e, por isso, muitas espécies são utilizadas no paisagismo de jardins (Smith, 1989; Medina, 1990; Endres *et al.*, 2002; Endres e Mercier, 2003).

Não somente por possuírem as características citadas, mas também por sua fascinante beleza e exuberância, com cores e forma interessantes, as Bromeliaceae têm sido amplamente utilizadas para fins paisagísticos e uma das maiores fontes de abastecimento desse mercado passou a ser o extrativismo (Coffani-Nunes e Forzza, 2001). Essa forma de abastecimento tem levado ao acelerado processo de destruição de ambientes naturais, e tem causado reduções drásticas nas populações com conseqüente perda de diversidade de Bromeliaceae (Forzza, 1998; Coffani-Nunes e Forzza, 2001). Essa realidade pode levar à destruição de populações de espécies nativas por pessoas que encontram nessas plantas fonte de renda. O extrativismo pode ser observado pelo país, mas principalmente na região Sudeste, que segundo levantamentos realizados, no Rio de Janeiro, em São Paulo (Andrade e Demateê, 1999; Coffani-Nunes e Forzza, 2001) e em Minas Gerais (Valente *et al.*, 2001), abastecem cerca de 50% do mercado, podendo alcançar números ainda maiores dependendo da localidade. Esses fatos são alarmantes, principalmente quando se leva em conta que a maioria das espécies de Bromeliaceae possui populações reduzidas e, muitas vezes, endêmicas (Coffani-Nunes e Forzza, 2001).

Como resultado dos trabalhos do *workshop* de *Revisão da Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção*, realizado em 2005 pela Fundação Biodiversitas, grande número de espécies que ocorrem no domínio da Floresta Atlântica Brasileira foi incluído nas categorias de “em perigo” ou de “criticamente ameaçadas” (Fundação Biodiversitas, 2005).

Dentre as quatro espécies de *Pitcairnia* incluídas nessas listas, três ocorrem no estado do Rio de Janeiro, sendo *Pitcairnia albiflos* Herb. uma espécie criticamente ameaçada. *Pitcairnia albiflos* Herb. é uma espécie endêmica dos afloramentos rochosos do município do Rio de Janeiro, RJ (Wendt e Chamas, 1997). Sua ocorrência foi registrada na Pedra da Gávea, Morro da Urca, Morro do Pão de Açúcar, Corcovado e em alguns afloramentos rochosos da Floresta da Tijuca. As populações dessa espécie vêm sofrendo com o pisoteio de alpinistas, queimadas anuais e pela invasão de gramíneas exóticas.

1.2. Micropropagação

Uma das possíveis alternativas para amenizar a ameaça de extinção e de perda de biodiversidade é a cultura de tecidos, que vem sendo utilizada há mais de 50 anos (Zornig, 1996). Devido às elevadas taxas de multiplicação em um curto período de tempo, o cultivo *in vitro* pode ser uma alternativa de abastecimento do mercado consumidor, promovendo redução no extrativismo vegetal e ainda possibilitando a recomposição de populações em ambiente natural (Dal Vesco *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011).

Inicialmente, trabalhos envolvendo a micropropagação de Bromeliaceae foram desenvolvidos por Mapes (1973) na década de 70. A germinação de sementes *in vitro*, a cultura de segmentos nodais, a cultura de explantes foliares e a produção de sementes sintéticas são as principais formas de cultivo *in vitro* (Carneiro *et al.*, 1999; Soneji *et al.*, 2002; Arrabal *et al.*, 2002; Dal Vesco *et al.*, 2011).

Os meios de cultura mais utilizados para a propagação de Bromeliaceae são o meio de Murashige e Skoog (1962), conhecido por meio “MS” e o meio de Knudson (1946) ou meio “K”, em suas formulações básicas ou diluídas. Os reguladores de crescimento mais utilizados nos cultivos *in vitro* de Bromeliaceae são o ácido naftaleno acético (ANA), o benzil amino purina (BAP) e o ácido giberélico (GA₃), o tidiazuron (TDZ) dentre outros (Arrabal *et al.*, 2002; Droste *et al.*, 2005; Guerra e Dal Vesco, 2010; Dal Vesco *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011).

As Bromeliaceae, em condições naturais, apresentam taxas de propagação lentas, e a cultura de tecidos surge como uma opção eficiente e atrativa por possibilitar

a propagação de um grande número de plantas geneticamente homogêneas a partir de uma única planta, sob condições que tornam os explantes livres de problemas fitossanitários (Barboza *et al.*, 2004; Droste *et al.*, 2005). A técnica ainda permite a conservação de germoplasma de espécies em risco de extinção, seja *in vitro* ou em casas de vegetação, possibilitando a conservação da biodiversidade (Arrabal *et al.*, 2002; Guerra e Dal Vesco, 2010).

1.3. Aclimatização *ex vitro*

Para que a propagação *in vitro* seja efetiva no que diz respeito à comercialização de mudas e até mesmo para manutenção de plantas em casa de vegetação ou para a tentativa de reintrodução em condições de campo, após a propagação em laboratório as plantas passam por um momento crítico, a etapa de aclimatização *ex vitro*, em que elas ficam muito susceptíveis à desidratação e morte.

Essa etapa envolve a transferência das plantas da condição de cultivo *in vitro* para casas de vegetação, onde passam por uma aclimatização e endurecimento. Segundo diversos estudos (Grattapaglia e Machado, 1998; Rogalski *et al.*, 2003 e Hazarika, 2003), esse procedimento é um fator limitante ao sucesso da micropropagação, pois as plantas passam por uma situação de reduzido fluxo transpiratório, devido à baixa intensidade de luz e à elevada umidade relativa, para um ambiente em que a transpiração é aumentada, ficando susceptível ao estresse hídrico; a planta passa de uma situação heterotrófica, em que ela depende do suprimento de energia pelo fornecimento externo de sacarose no meio de cultura, para uma situação autotrófica, em que há a necessidade de realizar fotossíntese; a planta muda de um meio com alta disponibilidade de nutrientes para outro em que ela precisa incrementar rapidamente a absorção de sais e passa de um ambiente livre de contaminações para outro onde está sujeita a ação de microrganismos saprofíticos e patogênicos.

Inúmeras são as dificuldades na etapa de transplântio e aclimatização *ex vitro*. O sucesso desse procedimento depende em grande parte da qualidade das plantas provenientes da etapa de cultivo *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1998; Hartman *et al.*, 2002). Pré-tratamentos com redução da umidade relativa nos frascos de cultura podem ser aplicados para aumentar a sobrevivência ao transplântio. Brainerd e Fuchigami (1981) aumentaram a sobrevivência das plantas abrindo as tampas dos frascos ainda na sala de incubação, durante 4 a 5 dias antes do transplântio, submetendo as plantas a uma umidade relativa de 30 a 40%. Essa pré-aclimatização

resultou em adaptação mais rápida dos estômatos do que em plantas transplantadas diretamente para casa de vegetação.

Os efeitos de diferentes sistemas de vedação, hermético e não-hermético, sobre o crescimento *in vitro* e sobre o conteúdo de clorofilas foram avaliados por Chanemougasoundharam *et al.* (2004). Plântulas cultivadas em frascos fechados hermeticamente apresentavam peso fresco elevado, diversas anormalidades morfológicas, alto índice de senescência e teores de clorofilas reduzidos, o que é muito prejudicial à aclimatização em condições *ex vitro*.

O tipo de tampa utilizado para o fechamento dos frascos de cultura também pode influenciar diretamente o sucesso da aclimatização. Chen *et al.* (2006a) observaram redução nos parâmetros de crescimento e na taxa de aclimatização *ex vitro* em explantes da espécie medicinal *Scrophularia yoshimurae* quando cultivadas em sistemas empregando o fechamento com papel alumínio em comparação com tampas que permitiam trocas gasosas. Estudos de microscopia eletrônica evidenciaram que plantas cultivadas em atmosfera ventilada apresentam menor densidade estomática e células estomáticas de menor tamanho, o que resulta em maior taxa de sobrevivência dessas plantas durante a aclimatização *ex vitro*. Além desses fatores, Chen *et al.* (2006b) observaram que as plantas cultivadas em recipientes fechados com papel alumínio apresentavam maior ocorrência de tecidos hiperhídricos, ausência de cera epicuticular e estômatos não-funcionais, o que reduz a sobrevivência ao transplantio.

O tipo de sistema radicular obtido no estágio de enraizamento *in vitro* também pode determinar o sucesso do transplantio. Raízes ainda curtas são mais desejáveis, pois facilitam a lavagem e a retirada do meio de cultura aderido, bem como a introdução das plantas no substrato. Além disso, raízes curtas ou ainda na forma de primórdios radiculares encontram-se em crescimento ativo. Para obter elevada eficiência na etapa de transplantio é primordial que ela seja sincronizada com a fase de enraizamento, de modo que, aos primeiros sinais de emergência de raízes *in vitro*, as plantas sejam imediatamente transplantadas. Após o transplantio, o estresse hídrico das plantas é geralmente o maior problema (Wardle *et al.*, 1983).

Plantas aparentemente perfeitas *in vitro* podem apresentar uma série de deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, resultando em rápida perda de água. *In vitro* os estômatos não são funcionais e respondem muito lentamente ao estresse hídrico; a camada de cera protetora sobre as folhas é mínima ou inexistente; a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda é precária para permitir um fluxo transpiratório adequado (Hartman *et al.*, 2002). A manutenção de umidade relativa elevada desde a retirada das plantas do meio de

cultura até se verificar a retomada do crescimento é um fator-chave para a sobrevivência. As plantas passam a realizar fotossíntese em níveis suficientes para estimular o desenvolvimento de novas raízes funcionais, um passo importante, pois as raízes formadas *in vitro* são pouco ramificadas e não conseguem absorver prontamente água e sais minerais do substrato de transplântio. Com a normalização do processo de absorção de sais e água, o crescimento da parte aérea reinicia, preparando a planta para o transplântio final em condições de campo. Durante as duas ou três primeiras semanas, deve-se reduzir gradativamente a umidade relativa no ambiente (Grattapaglia e Machado, 1998).

Para o sucesso na aclimatização, o substrato de transplântio também deve ter boa capacidade de retenção de umidade e não compactar excessivamente, o que compromete a drenagem e a aeração do sistema radicular. Quimicamente ele deve ser de preferência inerte, para permitir a manipulação dos conteúdos de nutrientes de acordo com as necessidades da espécie. Os substratos comumente utilizados incluem vermiculita, perlita, areia, turfa, casca curtida de eucalipto ou pinheiro, palha de arroz carbonizada e pó de carvão. As proporções de cada um dos componentes podem variar bastante, conforme a espécie. Dependendo do período necessário para completar o crescimento, adubações em cobertura são realizadas com soluções nutritivas, via irrigação no substrato ou por aplicações foliares (Grattapaglia e Machado, 1998; Hartman *et al.*, 2002).

Outro aspecto que requer cuidados durante a aclimatização é a condição fitossanitária do ambiente de transplântio. A alta umidade relativa que se faz necessária para a sobrevivência das plantas é extremamente favorável ao rápido desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Aliada a essa condição, a fragilidade dos tecidos, pouco lignificados e desprovidos de camada cuticular, deixa a planta susceptível à invasão de microrganismos saprofíticos e ao ataque de patógenos. Os vasos ou bandejas devem ser limpos e, de preferência, lavados em solução de hipoclorito de sódio. O substrato deve ser esterilizado por meio de autoclavagem, fumigação ou pasteurização em caldeiras (Hartman *et al.*, 2002).

O sucesso nos protocolos de micropropagação depende, em última análise, da sobrevivência das plantas em condições de campo após a aclimatização. Sem um procedimento adequado de endurecimento não é possível levar plantas do laboratório para o campo e alcançar os benefícios esperados a partir do cultivo *in vitro*. Segundo Gour *et al.* (2007), um dos parâmetros mais eficientes para a determinação do estágio adequado do endurecimento é o conteúdo de clorofilas. Para esses autores, quando o conteúdo de clorofila em plantas oriundas de cultivo *in vitro* alcança 95% dos valores

encontrados em plantas mantidas em ambiente natural elas podem ser consideradas adequadamente endurecidas para sobreviverem em condições de campo.

Segundo Jeon *et al.* (2006), o conteúdo relativo de água (CRA) reduziu entre 50-70% do normal observado em plantas de uma espécie com metabolismo fotossintético MAC dois dias após o transplântio, sendo recuperado, entretanto, com o progresso da aclimatização. Todavia, o conteúdo de clorofila aumentou em resposta ao incremento da umidade relativa, embora, a relação clorofila *a/b* não tenha sido alterada e a relação clorofila/carotenóides tenha aumentado em condições de temperaturas baixas.

1.4. Estresse oxidativo durante a aclimatização *ex vitro*

Durante o processo de aclimatização, as plantas passam por vários tipos de estresses e a transição das plantas para condições *ex vitro*, sob elevada irradiância, baixa umidade, entre outros fatores, pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Aragón *et al.*, 2010). O oxigênio na sua forma molecular (O_2) é relativamente não-reativo, mas é capaz de gerar reações letais em seus estados excitados como radicais livres e seus derivados (Scandalios, 1993). As ROS incluem o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). O O_2 , quando energizado, forma o oxigênio “singleto” (1O_2) que em conjunto com o radical hidroxila são extremamente reativos e tóxicos aos organismos, podendo reagir com ácidos graxos insaturados e causar a peroxidação de lipídios nas membranas celulares (Scandalios, 1993). As ROS estão presentes em todas as plantas e são resultantes de reações normais do metabolismo aeróbico. Porém, o seu acúmulo pode causar danos aos componentes celulares e interromper funções metabólicas podendo levar as células à morte (Anderson *et al.*, 1995; Resende *et al.*, 2003). Quando em condições fisiológicas normais, as plantas possuem um sistema dissipador que mantém as ROS abaixo dos níveis que podem causar problemas, mantendo a planta protegida do estresse oxidativo (Anderson *et al.*, 1995). Para isso elas possuem mecanismos de defesa enzimáticos e, ou, não enzimáticos (Scandalios, 1993; Carvalho e Amâncio, 2002; Agarwal e Shaheen, 2007).

Segundo Scandalios (1993), as defesas enzimáticas antioxidantes incluem enzimas capazes de remover, neutralizar ou dissipar radicais livres e seus intermediários e sem essas defesas seria impossível a conversão da energia luminosa em energia química. Dentre os mais importantes mecanismos dissipadores de ROS em plantas estão incluídas as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase (POD). Além dessas enzimas, os carotenóides, o ascorbato, o

monodesidroascorbato, o α -tocoferol e a glutathiona reduzida atuam nos mecanismos de defesa não-enzimáticos (Mittler, 2002).

Os radicais O_2^- transformam-se espontaneamente em H_2O_2 , porém a reação é muito mais efetiva se for catalisada pela superóxido dismutase (SOD). A SOD é uma metaloenzima (Saher *et al.*, 2004) responsável pela dismutação do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (Asada *et al.*, 1974; Giannopolitis e Ries, 1977). A SOD e a CAT atuam dissipando, respectivamente, os radicais superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) das células (Asada, 1992; Scandalios, 1993). Essa dissipação é importante porque os radicais superóxido (O_2^-) em conjunto com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem reagir com íons de Fe (reação “Haber-Weiss”) gerando o radical hidroxila ($\cdot OH$), que rapidamente pode atacar macromoléculas e causar sérios danos aos componentes celulares e até a morte celular (Scandalios, 1993). A CAT é responsável por converter o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2), fazendo a remoção do peróxido de hidrogênio nos peroxissomos e mitocôndrias. Nos cloroplastos, essa remoção fica a cargo das ascorbato e glutathiona peroxidases (Anderson *et al.*, 1995).

A peroxidase (POD) e a polifenol oxidase (PPO) são enzimas que podem atuar com grande variedade de substratos, como as aminas aromáticas, naftóis, metoxibenzenos e, na presença de oxigênio, sobre os fenóis, oxidando-os (Carneiro *et al.*, 2003). A POD, além de remover o H_2O_2 e colaborar na desintoxicação da planta, também apresenta envolvimento direto na lignificação dos tecidos, tornando-os mais endurecidos e resistentes (Campos e Silveira, 2003). A PPO ainda pode promover a atividade da POD com a geração de H_2O_2 através da oxidação de compostos fenólicos. As duas enzimas ainda atuam na defesa do organismo vegetal através da oxidação de compostos fenólicos endógenos em quinonas, que são tóxicas à patógenos invasores (Krishna *et al.*, 2008).

A ação combinada da SOD, da CAT e de PODs de diversos tipos na presença de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato, por exemplo, pode efetivamente eliminar, dissipar e, ou, imobilizar espécies tóxicas de oxigênio (Scandalios, 1993; Siegel, 1993). A ação desse sistema resulta na conversão dos radicais O_2^- e H_2O_2 , potencialmente danosos, em água e oxigênio molecular (Scandalios, 1993). As atividades conjuntas dessas e de outras enzimas relacionadas ao metabolismo antioxidativo podem indicar o nível de estresse e a capacidade de tolerância e de adaptação das plantas às condições de cultivo *ex vitro*.

Os danos causados pelo estresse hídrico são minimizados pelo sistema enzimático antioxidativo, bem como por outros processos fisiológicos e bioquímicos que induzem e, ou, aceleram a produção ou o acúmulo de solutos compatíveis

(Molinari *et al.*, 2007). Esses mecanismos proporcionam o crescimento e a reprodução das plantas em ambientes com limitações hídricas. Nessas condições, plantas superiores acumulam açúcares, ácidos orgânicos e íons no citosol, o que possibilita a diminuição do potencial osmótico e a manutenção do potencial hídrico e do turgor (Maia *et al.*, 2007). Em condições de estresse abiótico, os açúcares solúveis totais, além de atuar na regulação osmótica, ainda ajudam no controle das ROS. Açúcares como manitol e o dissacarídeo trealose, podem atuar como protetores contra danos foto-oxidativos e como sinalizadores moleculares que regulam, respectivamente, os metabolismos do carbono e do ácido abscísico sob condições de estresse (Miller *et al.*, 2010). O aminoácido prolina é o osmoprotetor mais amplamente acumulado em resposta a diferentes estresses. O acúmulo de prolina livre é de fundamental importância para a adaptação das plantas. Nessas condições, a prolina pode atuar como mediadora do ajustamento osmótico, estabilizadora de estruturas subcelulares, dissipadora de radicais livres e tampão redox bem como importante componente das proteínas da parede celular (Molinari *et al.*, 2007).

Uma pré-adaptação à condição autotrófica pode ser estimulada nas plantas ainda *in vitro*. Para isso, pode-se reduzir ou eliminar a fonte de açúcar no meio de enraizamento e aumentar a concentração de CO₂ e a intensidade luminosa no ambiente de incubação, dando condições às plantas de realizarem fotossíntese (Zobayed *et al.*, 2004; Kozai, 2010; Xiao *et al.*, 2011). Existem diversas evidências de que a sacarose adicionada ao meio de cultura afeta negativamente a sobrevivência ao transplante. Todavia, Fuentes *et al.* (2005) argumentam que isso somente é verdadeiro sob as condições de baixa irradiância observadas nas salas de crescimento, uma vez que quando as plantas são cultivadas sob elevada irradiância esses problemas ocorrem apenas em concentrações muito elevadas de sacarose.

A aclimatização das plantas às condições *ex vitro* é um momento crítico da micropropagação, uma vez que elas se tornam bastantes susceptíveis aos estresses ambientais. Em função disso, o presente trabalho teve por objetivos estudar alguns elementos enzimáticos e não enzimáticos do sistema de proteção antioxidativo durante o processo de aclimatização *ex vitro* de plantas de *Pitcairnia albiflos* cultivadas *in vitro* na presença de diferentes concentrações de sacarose, tampas de vedação e reguladores de crescimento, assim como avaliar o comportamento de plantas dessa espécie submetidas à desidratação e à posterior reidratação em condições de casa de vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

A espécie estudada no presente trabalho, *Pitcairnia albiflos* Herb. encontrava-se estabelecida *in vitro* no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da UFJF, sendo proveniente de sementes coletadas em condições naturais, mediante licença dos órgãos reguladores, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

As plantas foram cultivadas em tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro por 15 cm de altura em meios de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) adicionados de ácido giberélico (GA₃) a 5 µM ou de ácido naftaleno acético (ANA) na concentração de 0,1 µM, uma vez que com esses reguladores de crescimento e suas respectivas concentrações, as plantas de *Pitcairnia albiflos* apresentaram desenvolvimento superior em ensaios anteriores. Além dos efeitos desses reguladores de crescimento, foram avaliados os efeitos de duas concentrações de sacarose, 15 ou 30 g L⁻¹, e de dois tipos de vedação dos tubos de ensaio utilizando-se tampas, ambas de PVC, sendo que um tipo permitia a ocorrência de trocas gasosas e a outra era vedada com filme de PVC esticável, auto-aderente, de 15 µ de espessura (Vitaspencer, Goodyear) restringindo a ventilação. Os tubos de ensaio contendo as plantas foram mantidos em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (26 °C ± 1°C), fotoperíodo (16-8 h) e luminosidade (40 µmoles m⁻² s⁻¹) permanecendo nesse ambiente por 140 dias, quando as plantas foram submetidas a diferentes análises bioquímicas e transferidas para condições *ex vitro*.

Após a manutenção das plantas *in vitro* nos diferentes tratamentos, elas foram submetidas à aclimatização, sendo retiradas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas para eliminar os restos de meios de cultura. As plantas foram transferidas para bandejas de isopor (*speedlins*) de 128 células, preenchidas com substrato Plantmax Hortaliças® (Eucatex) umedecido e cobertas com lâmina plástica transparente, sendo mantidas sob sombreamento. Após 30 dias, os materiais foram transferidos para casa de vegetação, com sistema de nebulização automatizado, sob plástico e sombrite® 75%.

Plantas em fase de aclimatização provenientes dos tratamentos contendo GA₃, tampas vedadas com filme de PVC (restringindo a ventilação) e 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose foram submetidas a um ensaio de tolerância à desidratação, permanecendo por 24, 38 ou 52 dias sem irrigação e posteriormente submetidas à reidratação, sendo mantidas sob nebulização automatizada, plástico e sombrite 75% por 34 dias. Esses

materiais foram comparados com os seus respectivos controles, mantidos sob irrigação periódica.

Aos 140 dias de cultivo *in vitro*, no 70º dia após o transplante para condição *ex vitro* e também após a realização dos experimentos de tolerância à desidratação e reidratação, amostras das plantas de *Pitcairnia albiflos* foram submetidas a diferentes determinações bioquímicas.

As tabelas a seguir apresentam um resumo dos esquemas de montagem dos experimentos:

Experimentos de *cultivo in vitro* e aclimatização:

Regulador de crescimento	Sacarose	Tipo de vedação	Tratamento
GA ₃ (ácido giberélico)	15 g L ⁻¹	NV	1
		V	2
	30 g L ⁻¹	NV	3
		V	4
ANA (ácido naftaleno acético)	15 g L ⁻¹	NV	5
		V	6
	30 g L ⁻¹	NV	7
		V	8

NV = tampas não vedadas com plástico filme de PVC

V = tampas vedadas com plástico filme de PVC

Experimentos de desidratação e reidratação:

Regulador de crescimento	Sacarose	Desidratação (dias)	Tratamento
GA ₃ (ácido giberélico)	15 g L ⁻¹	0	1
		24	2
		38	3
		52	4
GA ₃ (ácido giberélico)	30 g L ⁻¹	0	5
		24	6
		38	7
		52	8

Reidratação: durante 34 dias com irrigação periódica

2.2. Análises bioquímicas

2.2.1. Obtenção dos extratos brutos para determinações das proteínas totais, atividades enzimáticas, conteúdos de prolina e pigmentos fotossintéticos

Os extratos brutos para as determinações dos teores de proteínas totais, das atividades da catalase (CAT), da peroxidase (POD), da polifenol oxidase (PPO) e da superóxido dismutase (SOD) foram obtidos pela maceração de 0,3 g de tecidos foliares em N₂ líquido, seguida da adição de 10 mL de meio de homogeneização, da filtração através de quatro camadas de gaze e da centrifugação a 10.000 g por 15 minutos, a 4°C. Para a obtenção do homogeneizado para a determinação do conteúdo de prolina, também foram macerados 0,3 g de tecidos foliares em N₂ líquido, seguido da adição de 10 mL de meio de homogeneização e filtração em papel Whatman nº 2. No caso dos pigmentos fotossintéticos, foram macerados 0,1 g de tecidos foliares em N₂ líquido, adicionados de 25 mL de solvente de extração em balão volumétrico, após filtração em papel filtro. Os meios de homogeneização e extração foram constituídos de: 1) Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM (Peixoto *et al.*, 1999), para as enzimas CAT, POD, PPO e SOD; 2) Ácido sulfosalicílico 3% (p/v) para o conteúdo de prolina (Bates *et al.*, 1973) e 3) Acetona 80% (v/v) para os conteúdos de pigmentos fotossintéticos (Lichtenthaler, 1987).

2.2.2. Determinação de proteínas totais

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Lowry *et al.* (1951) modificado. Os reagentes utilizados foram o A, constituído de 0,5 % (p/v) de CuSO₄.5H₂O em 1% (p/v) de citrato de sódio e o B, composto de 2% (p/v) de Na₂CO₃ em NaOH 0,10 N. O reagente C foi preparado pela mistura da proporção de 50:1 (v/v) dos reagentes B e A, respectivamente. O reagente D foi constituído do reagente fenol Folin-Ciocalteu, diluído a 50% (v/v) com água destilada.

Após o preparo dos reagentes, utilizou-se 100 µL do extrato enzimático bruto acrescido, suavemente, de 2,5 mL do reagente C. Deixou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a adição de 0,25 mL do reagente D, agitando-se a mistura em vórtex, deixando-a em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a absorvância foi lida a 735 nm, sendo o teor de proteínas determinado por intermédio de curva de calibração, utilizando BSA 1 mg/mL

como padrão. Posteriormente o teor de proteínas foi utilizado para os cálculos das atividades específicas das enzimas catalase, superóxido dismutase, peroxidase e polifenol oxidase.

2.2.3. Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT nos tecidos foi determinada após a adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de H₂O₂ 12,5 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30°C (Havir e McHale, 1987). A atividade enzimática foi determinada pela medição do consumo de H₂O₂ considerando o decréscimo na absorvância a 240 nanômetros (nm) utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹cm⁻¹ (Anderson *et al.*, 1995).

2.2.4. Determinação da atividade da peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO)

As atividades da POD e da PPO foram determinadas pelo método de Kar e Mishra (1976). Alíquotas de 100 µL do extrato enzimático foram adicionadas a 4,9 mL de uma mistura de reação contendo tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (excluído do meio de incubação da PPO). Após incubação da solução por 1 minuto a 25°C, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de H₂SO₄ 5% (v/v) e a absorvância da solução, então, lida a 420 nm contra um “branco” em que a enzima foi previamente inativada pela adição de 0,5 mL de H₂SO₄ 5% (v/v). As atividades da POD e da PPO foram determinadas pela medição da quantidade de purpurogalina formada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955).

2.2.5. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD nos tecidos foi determinada pela metodologia proposta por Del Longo *et al.* (1993). À mistura de reação constituída de metionina 13 mM, azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 100 nM e riboflavina 2 µM em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, adicionou-se 100 µL do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente e, após 4 minutos,

interrompida pelo desligamento da mesma (Giannopolitis e Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm, subtraído de um “branco” no qual a mistura de reação foi mantida no escuro. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

2.2.6. Determinação do conteúdo de prolina

O filtrado foi reagido com reagente de ninhidrina e ácido acético (150 mL de ácido acético, 100 mL de ácido fosfórico 6 M e 6,25 g de ninhidrina (v/v/p)) durante 1 hora a 100°C. Em seguida o material foi transferido para banho de gelo. O cromóforo proveniente da reação foi extraído com tolueno, sendo este aspirado da fase aquosa superior após agitação em vórtex e separação das fases. Em seguida a absorvância foi lida a 520 nm sendo o conteúdo de prolina determinado por intermédio de uma curva de calibração, utilizando-se solução de prolina 1 mM como padrão (Bates *et al.*, 1973).

2.2.7. Composição de pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e de carotenóides totais foram determinados pela metodologia proposta por Lichtenthaler (1987), utilizando-se as leituras das absorvâncias a 663, 647 e 470 nm.

2.2.8. Teores de carboidratos

Nos ensaios de tolerância à desidratação e reidratação, além dos parâmetros bioquímicos anteriores, também foram determinados os teores de algumas classes de carboidratos.

2.2.8.1. Determinação do teor de sacarose

O teor de sacarose foi determinado segundo Van Handel (1968), modificado. Foram pesados 0,1 g de tecidos foliares frescos, homogeneizados em 1,5 mL da mistura MCW (metanol, clorofórmio e água; 12:5:3 v/v/v) e centrifugados a 3.500 g, por 30 minutos, a 4°C. A extração foi repetida duas vezes para o resíduo, os sobrenadantes reunidos e seu volume final determinado. A cada 2 mL deste

sobrenadante foram adicionados 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água destilada. Após vigorosa agitação e centrifugação da mistura (3.000 g, por 10 minutos, a 4°C), a fração aquosa metanólica (superior) foi coletada e incubada a 35°C, por 40 minutos, para a evaporação do clorofórmio residual. Do extrato resultante, uma alíquota de 0,1 mL foi utilizada nas análises, iniciadas pela adição de 0,1 mL de KOH 30% e incubação a 100°C, por 10 minutos. Após resfriamento, 3 mL de antrona 0,2% (p/v) em H₂SO₄ concentrado foram adicionados e as amostras incubadas a 40°C, por 20 minutos. Após o resfriamento, a absorvância das amostras foi lida a 620 nm em espectrofotômetro. A partir de uma curva padrão de sacarose, os resultados foram calculados e expressos em mg de sacarose g⁻¹ de MF.

2.2.8.2. Determinação do teor de carboidratos solúveis totais

O teor de carboidratos solúveis totais nos tecidos foi obtido pelo método de Dubois *et al.* (1956). Foram pesados 0,1 g de tecidos foliares frescos e colocados em tubos de ensaio de 15 mL e homogeneizados com 5 mL de água destilada e colocados em banho-maria por 30 minutos a 100°C. Os tubos de ensaio foram retirados do banho-maria e levados para extração das amostras através da centrifugação a 1000 rpm durante 10 minutos. Dos sobrenadantes coletados, retirou-se uma alíquota de 100 µL adicionada de 400 µL de H₂O destilada em tubos de ensaio, sendo submetidas à agitação vigorosa e homogeneização em vórtex. Depois, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% (p/v) e novamente agitados em vórtex. Posteriormente, foi adicionado uniformemente, de uma única vez, no centro de cada tubo, 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Em seguida, os tubos foram agitados novamente e colocados na bancada para repouso por 20 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 490 nm, tendo como branco água destilada (em substituição ao extrato) + reagentes adicionados na proporção de 0,5 mL de água destilada, 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄. Para o cálculo do teor de carboidratos solúveis totais utilizou-se uma curva-padrão de glicose e os resultados foram expressos em mg de glicose g⁻¹ de MF.

2.2.8.3. Determinação do teor de amido

Para a determinação do teor de amido nos tecidos o método utilizado foi o de Dubois *et al.* (1956). Foi feita uma extração etanólica de 0,1 g de tecidos foliares frescos em 5,0 mL de etanol 80% (v/v) por 30 minutos a 80°C e depois uma nova extração com 5,0 mL de ácido perclórico (HClO₄) 30% (v/v) por 30 minutos a 25°C. A

primeira e a segunda extração foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes de cada extração foram unidos e o volume aferido para 10 mL com água destilada para obtenção do extrato total. Nos tubos de ensaio foram colocados 100 µL do sobrenadante e 400 µL de H₂O destilada e então, submetidos à agitação em vórtex. Após esse procedimento, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e nova agitação em vórtex foi realizada. Logo após foi adicionado uniformemente no centro de cada tubo 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e mais uma vez os tubos foram agitados em vórtex. A leitura foi realizada após 20 minutos de repouso em espectrofotômetro ajustado a 490 nm. Para o cálculo do teor de amido utilizou-se uma curva-padrão de glicose sendo os resultados expressos em mg de glicose g⁻¹ de MF.

2.2.8.4. Determinação do teor de açúcares redutores

O teor de açúcares redutores foi determinado pela diferença entre os teores de CST e sacarose. Os resultados foram expressos em mg de glicose g⁻¹ de MF.

2.3. Determinação de parâmetros morfométricos e de umidade

Nos ensaios de tolerância à desidratação também foram calculados alguns parâmetros morfométricos e de umidade, com destaque para os conteúdos relativos de água (CRA) e suculência (Mantovani, 1999).

Para a determinação do conteúdo relativo de água (CRA), foram coletados discos foliares de 3 mm, dos quais foi determinada a massa de matéria fresca (MF1). Os discos foliares foram transferidos para placas de Petri com água destilada e deixados sobre uma bancada por 6 horas. Posteriormente, os discos foram removidos e colocados entre folhas de papel de filtro, pressionados para eliminação do excesso de água e, em seguida, novamente pesados (MF2). Logo após, os discos foram colocados em sacos de papel e transferidos para estufa a 75°C por 48 horas, visando à determinação da massa de matéria seca do material (MS). O conteúdo relativo de água foi calculado pela equação $CRA = 100 * [(MF1 - MS) / (MF2 - MS)]$. A suculência das folhas foi determinada utilizando-se a equação $SUC = [(MF1 - MS) / \text{área foliar}]$.

2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos envolvendo cada um dos diferentes meios de cultura contendo GA₃ ou ANA foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado

(DIC), com nove repetições, no esquema experimental fatorial 2 x 2 (concentração de sacarose 15 g x concentração de sacarose 30 g; tampas não vedadas x tampas vedadas com plástico filme de PVC), totalizando 4 tratamentos para cada regulador de crescimento. Nos experimentos de tolerância à desidratação e de reidratação foram testados dois tratamentos, variando-se a origem das plântulas em função da concentração de sacarose, 15 ou 30 g L⁻¹, durante o cultivo *in vitro*.

Os dados obtidos foram transformados pela \sqrt{x} e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade (Gomes, 1982). As análises foram realizadas utilizando-se o programa SAEG, versão 5.0.

3. RESULTADOS

Plantas de *Pitcairnia albiflos* Herb. (Figura 1), em geral apresentaram bom desenvolvimento tanto sob condições de cultivo *in vitro* quanto *ex vitro*. *In vitro*, as piores respostas quanto ao crescimento e desenvolvimento foram observadas nos tratamentos contendo a concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose, GA₃ e tampas vedadas com filme plástico de PVC (Figura 2). Nesse caso, as plantas se mostraram com características de hiperidricidade. Nas condições de cultivo *ex vitro*, após certo tempo de aclimatização, as plantas de todos os tratamentos apresentaram bom desenvolvimento, independente dos reguladores de crescimento, da concentração de sacarose adicionados ao meio de cultura e dos tipos de vedação utilizados (Figura 3), o que evidencia elevada capacidade de aclimatização dessa espécie.

Qualitativamente, nos tratamentos com a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, independente do tipo de vedação utilizado, as plantas se mostraram com melhor desenvolvimento, apresentando folhas maiores e mais largas, embora nos demais tratamentos, as plantas também tenham apresentado morfologia adequada (Figura 3).



Figura 1. Hábito de crescimento (A) e detalhe da inflorescência (B) de plantas de *Pitcairnia albiflos* aclimatizadas em casa de vegetação.



Figura 2. Plantas de *Pitcairnia albiflos* obtidas em resposta a diferentes reguladores de crescimento, concentrações de sacarose e tipos de vedação dos tubos de ensaio, aos 50 (A) e 140 (B) dias após o início do cultivo *in vitro*. Tratamentos: **1)** 5 μM GA₃/15 g L⁻¹ SAC/ tampas não vedadas; **2)** 5 μM GA₃/15 g L⁻¹ SAC/ tampas vedadas; **3)** 5 μM GA₃/30 g L⁻¹ SAC/ tampas não vedadas; **4)** 5 μM GA₃/30 g L⁻¹ SAC/ tampas vedadas; **5)** 0,1 μM ANA/15 g L⁻¹ SAC/ tampas não vedadas; **6)** 0,1 μM ANA/15 g L⁻¹ SAC/ tampas vedadas; **7)** 0,1 μM ANA/30 g L⁻¹ SAC/ tampas não vedadas; **8)** 0,1 μM ANA/30 g L⁻¹ SAC/ tampas vedadas.



Figura 3. Plantas de *Pitcairnia albiflos* 60 dias após início da aclimatização. Tratamentos de origem: **1)** 5 μM GA₃/15 g L⁻¹ SAC/ tampas não vedadas; **2)** 5 μM GA₃/15 g L⁻¹ SAC/ tampas vedadas; **3)** 5 μM GA₃/30 g L⁻¹ SAC/ tampas não vedadas; **4)** 5 μM GA₃/30 g L⁻¹ SAC/ tampas vedadas; **5)** 0,1 μM ANA/15 g L⁻¹ SAC/ tampas não vedadas; **6)** 0,1 μM ANA/15 g L⁻¹ SAC/ tampas vedadas; **7)** 0,1 μM ANA/30 g L⁻¹ SAC/ tampas não vedadas; **8)** 0,1 μM ANA/30 g L⁻¹ SAC/ tampas vedadas.

3.1. Análises bioquímicas das plantas mantidas *in vitro* e aclimatizadas *ex vitro* em casa de vegetação

3.1.1. Prolina

Na primeira análise, realizada após 140 dias da inoculação das plantas *in vitro*, os conteúdos de prolina encontrados nos tecidos cultivados na maior concentração de sacarose (30 g L⁻¹), foram mais elevados do que na concentração mais baixa (15 g L⁻¹), tanto para plantas cultivadas em presença de GA₃ (Figura 4A) quanto de ANA (Figura 4B). Diferenças significativas foram observadas entre as duas concentrações de sacarose para os dois tipos de vedação, tubos com tampas vedadas e tubos com tampas que permitiam trocas gasosas (não vedadas). Essa mesma dinâmica foi observada para os dois reguladores de crescimento na análise realizada aos 70 dias após a aclimatização *ex vitro*, sendo que na concentração mais baixa de sacarose,

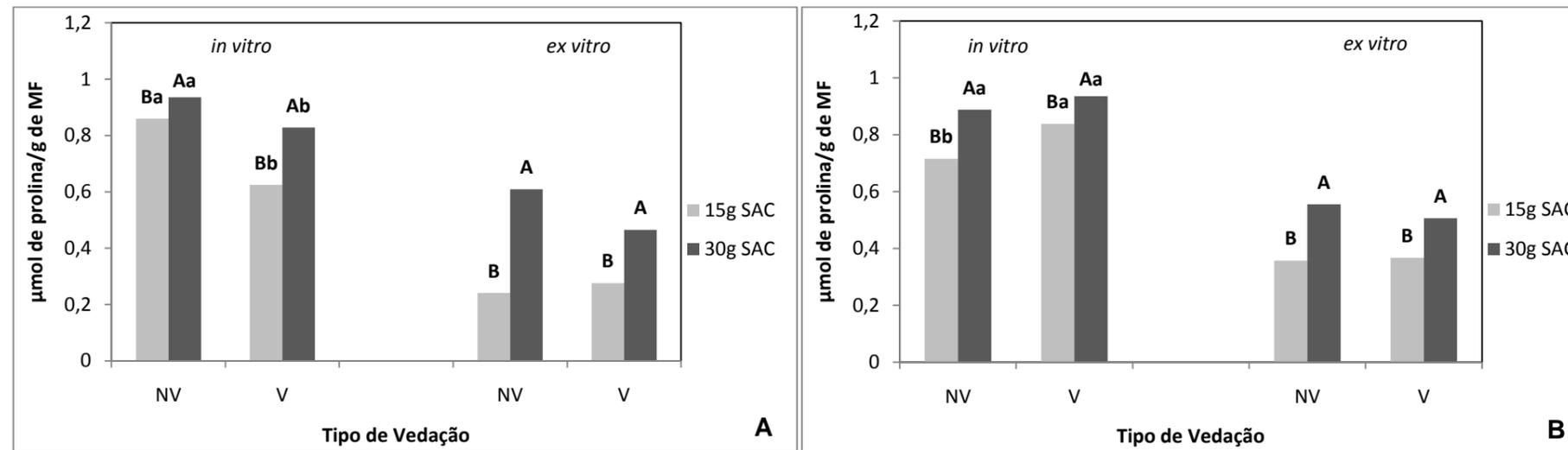


Figura 4. Conteúdo de prolina em tecidos de *Pitcairnia albiflos* cultivados *in vitro* na presença de GA₃ (A) ou ANA (B) e sacarose e *ex vitro*. **NV**= tampas não vedadas, **V** = tampas vedadas. Em cada ambiente de cultivo (*in vitro* ou *ex vitro*), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada tipo de vedação) comparam os efeitos da sacarose. As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (para cada concentração de sacarose) comparam o tipo de vedação utilizado *in vitro*. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

o conteúdo de prolina foi menor do que na concentração mais elevada. Embora os resultados tenham sido similares, os conteúdos de prolina observados após a transferência das plantas para casa de vegetação foram menores do que os encontrados na análise realizada com as plantas mantidas *in vitro*.

A diferença no acúmulo de prolina no campo foi mais acentuada entre os materiais provenientes de tratamentos com GA₃ do que com ANA.

3.1.2. Enzimas do metabolismo antioxidativo (catalase, superóxido dismutase, peroxidase e polifenol oxidase)

A atividade da catalase (CAT) nos tecidos provenientes de plantas cultivadas *in vitro* diferiu significativamente apenas naqueles cultivados em presença de GA₃ e com tampas não vedadas, sendo mais de 100% maior na concentração mais elevada de sacarose (30 g L⁻¹) (Figura 5A). Para tecidos cultivados com GA₃ em recipientes vedados e em todos os tratamentos contendo ANA (Figuras 5A e 6A), não ocorreram diferenças significativas, embora, no geral, os tratamentos com tampas vedadas tenham mostrado maiores concentrações de peróxido consumido por minuto, indicando maior atividade da CAT, principalmente, para tecidos cultivados em presença de GA₃. Em relação ao tipo de vedação utilizada nos tubos de ensaio, tampas vedadas e não vedadas, diferenças significativas foram observadas, independente do tipo de regulador de crescimento, sendo a maior atividade da CAT conferida nos tubos de ensaio com tampas vedadas (Figuras 5A e 6A).

Para as plantas tratadas anteriormente com GA₃ e mantidas em sistema de tampas que permitiam trocas gasosas (não vedadas), não ocorreram diferenças significativas. O contrário foi observado para materiais provenientes de sistemas com tampas vedadas, onde se registrou diferenças entre as duas concentrações de sacarose, sendo a atividade da CAT na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose 21% maior do que na menor concentração (Figura 5A).

Na análise realizada com tecidos de plantas aclimatizadas *ex vitro*, a atividade da CAT foi maior nos tecidos das plantas oriundas dos tratamentos contendo ANA, embora os tratamentos não tenham provocado diferenças significativas, apresentando concentrações de peróxido de hidrogênio consumido por minuto muito próximas, independente da concentração de sacarose e do tipo de vedação (Figura 6A).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) nos tecidos das plantas mantidas *in vitro* na presença de GA₃ apresentou diferenças significativas nos tratamentos que utilizaram tampas não vedadas, sendo 29,1% menor na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. Para materiais provenientes de sistemas utilizando tampas vedadas na presença de GA₃ e para todos os tratamentos contendo ANA, não foram detectadas diferenças significativas (Figuras 5B e 6B).

Aos 70 dias após a aclimatização *ex vitro*, a atividade da SOD, em presença de GA₃, foi mais baixa do que *in vitro* e não apresentou diferenças significativas entre as plantas oriundas das duas concentrações de sacarose (15 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹) e dos diferentes tipos de vedação (tampa vedada ou não vedada) dos tubos de ensaio (Figura 5B).

Em contraste, para os tratamentos contendo ANA, plantas com origem em tubos com tampas não vedadas ou vedadas, obtiveram diferenças significativas frente à menor e à maior concentração de sacarose, respectivamente. Onde as tampas permitiam trocas gasosas, a atividade da SOD na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose foi 16,4% menor, enquanto que nas plantas originárias de tubos com tampas vedadas observaram-se diferenças ainda maiores, sendo a atividade da SOD 34,2% menor na concentração mais elevada de sacarose (Figura 6B).

A atividade da peroxidase (POD) nos materiais mantidos *in vitro* na presença de GA₃, não apresentou diferenças significativas nos tecidos provenientes de tubos fechados com tampas não vedadas; contrariamente, os fechados com tampas vedadas apresentaram atividade 17,8% menor na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 5C). Na presença de ANA, não foram observadas diferenças significativas para os tipos de vedação independente da concentração de sacarose (Figura 6C). Entre os diferentes tipos de vedação, tubos com tampas vedadas e tubos com tampas não vedadas, independente do regulador de crescimento, houve diferenças significativas na atividade da POD, sendo a maior atividade dessa enzima conferida nos materiais provenientes dos tubos com tampas vedadas (Figuras 5C e 6C).

Nas condições de cultivo *ex vitro*, plantas com origem em meios de cultura suplementados com GA₃ e fechados com tampas vedadas apresentaram atividade enzimática 43% menor na concentração mais elevada de sacarose (Figura 5C). Já para aquelas com origem em meios suplementados com ANA e tampas não vedadas, a atividade da POD foi 22,9% menor na concentração mais elevada de sacarose (Figura 6C). Para os demais tratamentos, não foram verificadas diferenças significativas. Porém, vale ressaltar que as plantas aclimatizadas provenientes de meios de cultura contendo ANA, apresentaram as mais elevadas atividades dessa enzima.

A atividade da polifenol oxidase (PPO), na análise realizada com tecidos provenientes de plantas mantidas *in vitro* apresentou comportamento similar na presença do GA₃ ou do ANA. Independente do tipo de vedação utilizado, a atividade da PPO nos tecidos mantidos *in vitro* diferiu estatisticamente entre a menor (15 g L⁻¹) e a maior (30 g L⁻¹) concentração de sacarose. A maior atividade da PPO foi observada nos materiais cultivados na presença da menor concentração de sacarose, e em relação ao tipo de vedação, as maiores atividades da PPO foram detectadas nos materiais mantidos em tubos de ensaio com tampas vedadas (Figuras 5D e 6D).

Na presença de GA₃, a atividade da PPO foi 21,8% e 12,8% menor, respectivamente, para materiais mantidos em tubos de ensaio com tampas não

vedadas e vedadas, em resposta ao aumento da concentração de sacarose de 15 para 30 g L⁻¹. Já na presença de ANA, essa diferença foi ainda maior, sendo a atividade da PPO 42,7% e 33,3% menor, respectivamente, para materiais provenientes de tratamentos com tampas não vedadas e vedadas, em resposta ao aumento da concentração de sacarose.

Na condição *ex vitro*, diferenças significativas foram observadas somente nos materiais oriundos de meios de cultura contendo ANA e para tubos com tampas não vedadas, sendo a atividade da PPO 21,4% menor na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 6D). Nos demais tratamentos, não foram detectadas diferenças significativas pelo teste estatístico (Figuras 5D e 6D).

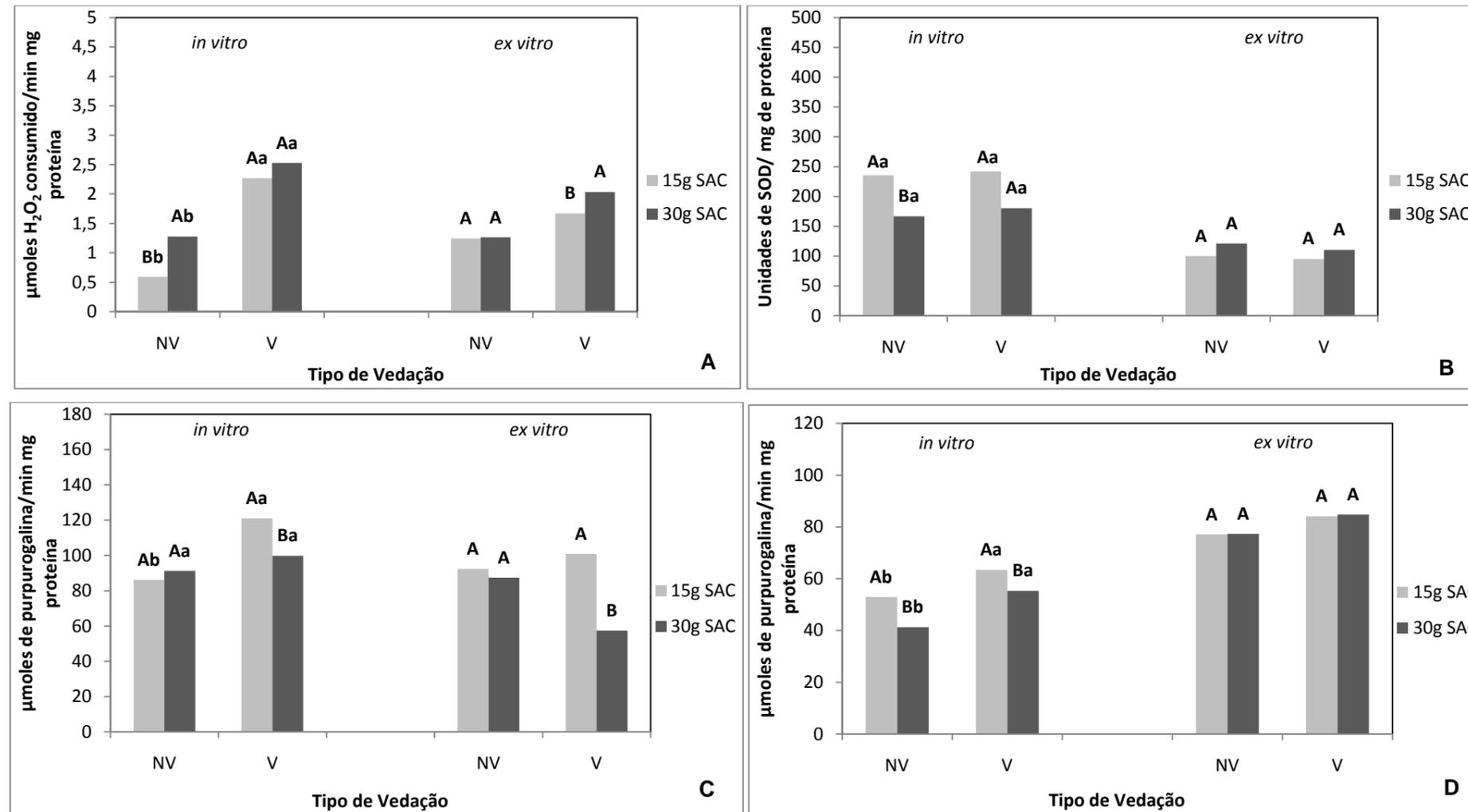


Figura 5. Atividades da catalase (CAT) (A), da superóxido dismutase (SOD) (B), da peroxidase (POD) (C) e da polifenol oxidase (PPO) (D) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* cultivados *in vitro* na presença de GA_3 e sacarose e *ex vitro*. **NV**= tampas não vedadas, **V** = tampas vedadas. Em cada ambiente de cultivo (*in vitro* ou *ex vitro*), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada tipo de vedação) comparam os efeitos da sacarose. As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (para cada concentração de sacarose) comparam o tipo de vedação utilizado *in vitro*. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

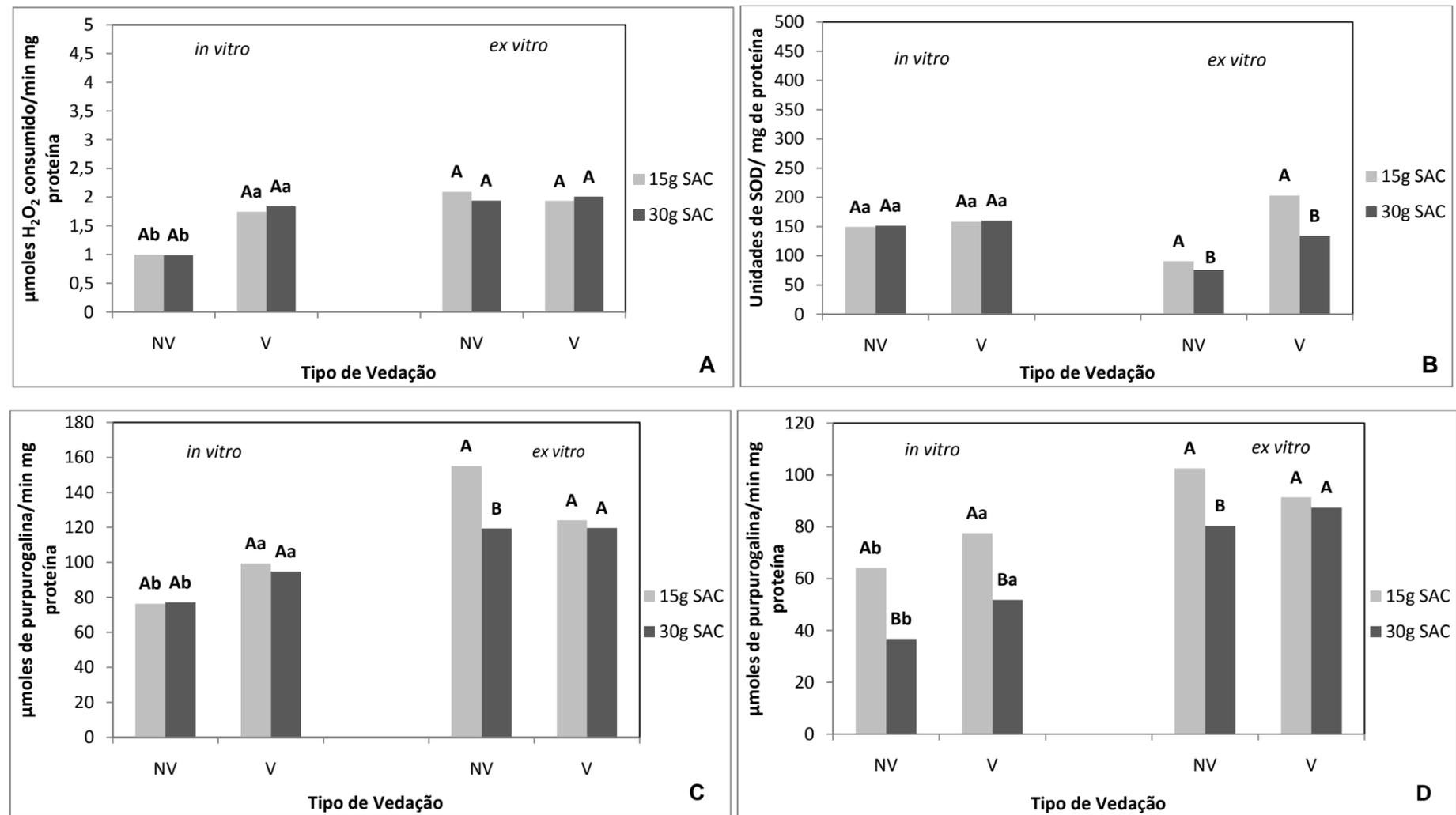


Figura 6. Atividade da catalase (CAT) (A), da superóxido dismutase (SOD) (B), da peroxidase (POD) (C) e da polifenol oxidase (PPO) (D) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* cultivados *in vitro* na presença de ANA e sacarose e *ex vitro*. **NV**= tampas não vedadas, **V** = tampas vedadas. Em cada ambiente de cultivo (*in vitro* ou *ex vitro*), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada tipo de vedação) comparam os efeitos da sacarose. As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (para cada concentração de sacarose) comparam o tipo de vedação utilizado *in vitro*. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.1.3. Pigmentos

As plantas cultivadas *in vitro* na presença de GA₃ apresentaram comportamento similar no que diz respeito aos teores das clorofilas *a* e *b*. Diferenças significativas para esses pigmentos foram observadas apenas para materiais mantidos em tubos com tampas vedadas. O teor de clorofila *a* foi 18,5% maior na concentração mais elevada de sacarose, ao passo que o teor de clorofila *b* foi 25% maior também na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7A). Nos tratamentos com ANA, diferenças significativas foram observadas apenas para clorofila *a* em materiais cultivados em tubos de ensaio com tampas não vedadas, sendo que o teor desse pigmento foi 17,9% maior na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 8A).

Aos 70 dias após aclimatização *ex vitro*, os teores de clorofila *b* em plantas originárias de tubos com tampas não vedadas e tratadas previamente tanto com GA₃ quanto com ANA, não apresentaram diferenças significativas. Todos os demais tratamentos apresentaram diferenças estatísticas para os teores de clorofilas *a* e *b* (Figuras 7A e 8A). Nas plantas originárias de tratamentos contendo GA₃, foi observado que os teores das clorofilas *a* e *b* foram maiores na concentração mais elevada de sacarose (Figura 7A). Em contraste, as plantas tratadas anteriormente com ANA mostraram comportamento contrário, sendo seus maiores teores de clorofilas *a* e *b* observados nos tratamentos com a concentração mais baixa de sacarose (Figura 8A). Plantas oriundas do tratamento com tampas não vedadas e GA₃ apresentaram teor de clorofila *a* 31,1% maior na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. As plantas tratadas com o mesmo regulador de crescimento e mantidas em frascos com tampas vedadas apresentaram teor de clorofila *a* 44,4% maior na mesma concentração de sacarose. O mesmo foi observado em relação ao teor de clorofila *b* em plantas tratadas com GA₃ em tubos com tampas vedadas, onde o teor de clorofila *b* também foi 44,4% maior na concentração mais elevada de sacarose (Figura 7A).

Aos 70 dias de aclimatização, as diferenças entre os teores de clorofilas *a* e *b* se mostraram menores nos tratamentos com ANA do que naqueles contendo GA₃. O teor de clorofila *a* foi 11,1% menor para materiais provenientes de tubos com tampas não vedadas e 30 g L⁻¹ de sacarose quando comparado com a menor concentração de sacarose. Nos materiais mantidos com tampas vedadas, essa diferença foi de 14,7% (Figura 8A). O teor de clorofila *b* em materiais provenientes de frascos utilizando tampas vedadas acompanhou essa mesma dinâmica, sendo 14,3% menor na concentração mais elevada de sacarose e tampas vedadas (Figura 8A).

O teor total de clorofilas apresentou resultados semelhantes aos obtidos para as clorofilas *a* e *b*. Nas condições de cultivo *in vitro* e na presença de GA₃, diferenças

significativas foram observadas somente em tubos com tampas vedadas, onde se verificou que o teor total de clorofilas foi 21,6% maior na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7B). Na presença de ANA, as diferenças ficaram restritas aos tratamentos com tampas não vedadas, onde o teor total desses pigmentos foi 11% maior também na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 8B).

Para as plantas aclimatizadas e previamente cultivadas em presença de GA₃, a resposta foi similar à descrita anteriormente, sendo o teor total de clorofilas na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose 29,2% e 44,4% maior, respectivamente, para plantas oriundas de tubos com tampas não vedadas e vedadas (Figura 7B). Na presença de ANA, o contrário foi observado, sendo o teor total de clorofilas na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose, 10,1% e 15,6% menor, respectivamente, para as plantas cultivadas anteriormente em tubos de ensaio com tampas não vedadas e vedadas (Figura 8B).

Os teores de carotenóides totais não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tratamentos durante a fase de cultivo *in vitro*, independente do tipo de regulador de crescimento adicionado ao meio de cultura (Figuras 7B e 8B). Em contraste, para as plantas aclimatizadas, praticamente todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas. Na concentração mais elevada de sacarose (30 g L⁻¹), as plantas com origem em meios de cultura contendo GA₃ apresentaram teor de carotenóides totais 35,7% e 53,8% maiores, respectivamente, para plantas originárias de tubos com tampas não vedadas e vedadas (Figura 7B). Todavia, as que tiveram origem em meio de cultura contendo ANA somente apresentaram diferenças significativas nos materiais mantidos anteriormente em frascos com tampas não vedadas, sendo 15% menor na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 8B).

As relações clorofila *a/b* e clorofilas totais/carotenóides totais não apresentaram diferenças significativas tanto para as condições de cultivo *in vitro* quanto para as condições *ex vitro*, não apresentando, também, diferenças significativas quanto ao tipo de vedação dos tubos de ensaio e concentração de sacarose (Figuras 7C e 8C). Uma única exceção foi observada *ex vitro* para plantas oriundas de meios de cultura contendo GA₃ mantidas em tubos com tampas não vedadas. Nessa condição, a relação clorofilas totais/carotenóides totais foi 11,3% maior nas plantas cultivadas em presença de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figuras 7C).

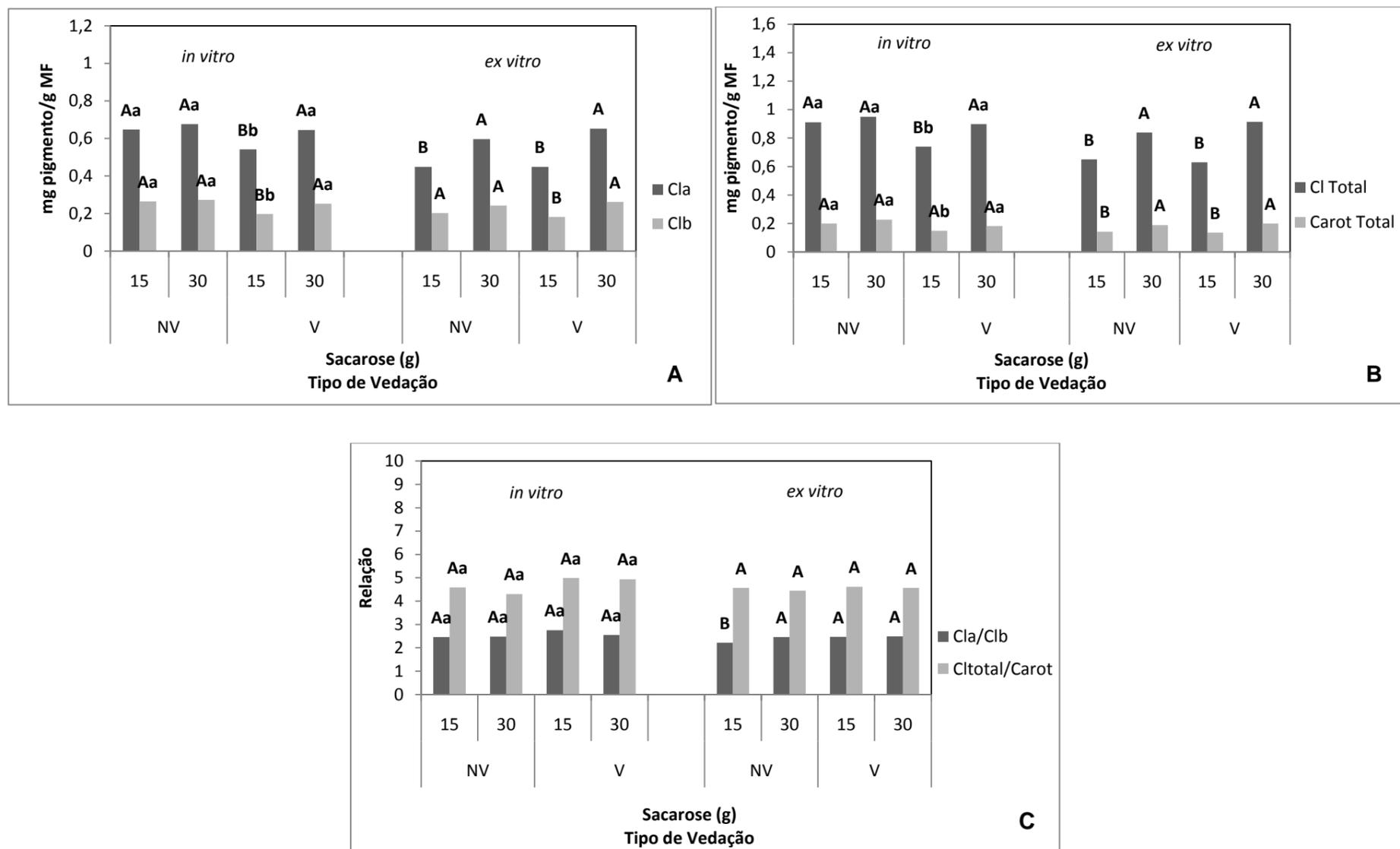


Figura 7. Teores de clorofila *a* e clorofila *b* (A), teores de clorofilas e carotenóides totais (B) e relação entre clorofilas *a* e *b* e relação entre clorofilas totais e carotenóides totais (C) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* cultivados *in vitro* na presença de GA₃ e sacarose e *ex vitro*. NV= tampas não vedadas, V = tampas vedadas. Para cada pigmento e para cada relação, em cada ambiente de cultivo (*in vitro* ou *ex vitro*), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada tipo de vedação) comparam os efeitos da sacarose. As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (para cada concentração de sacarose) comparam o tipo de vedação utilizado *in vitro*. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

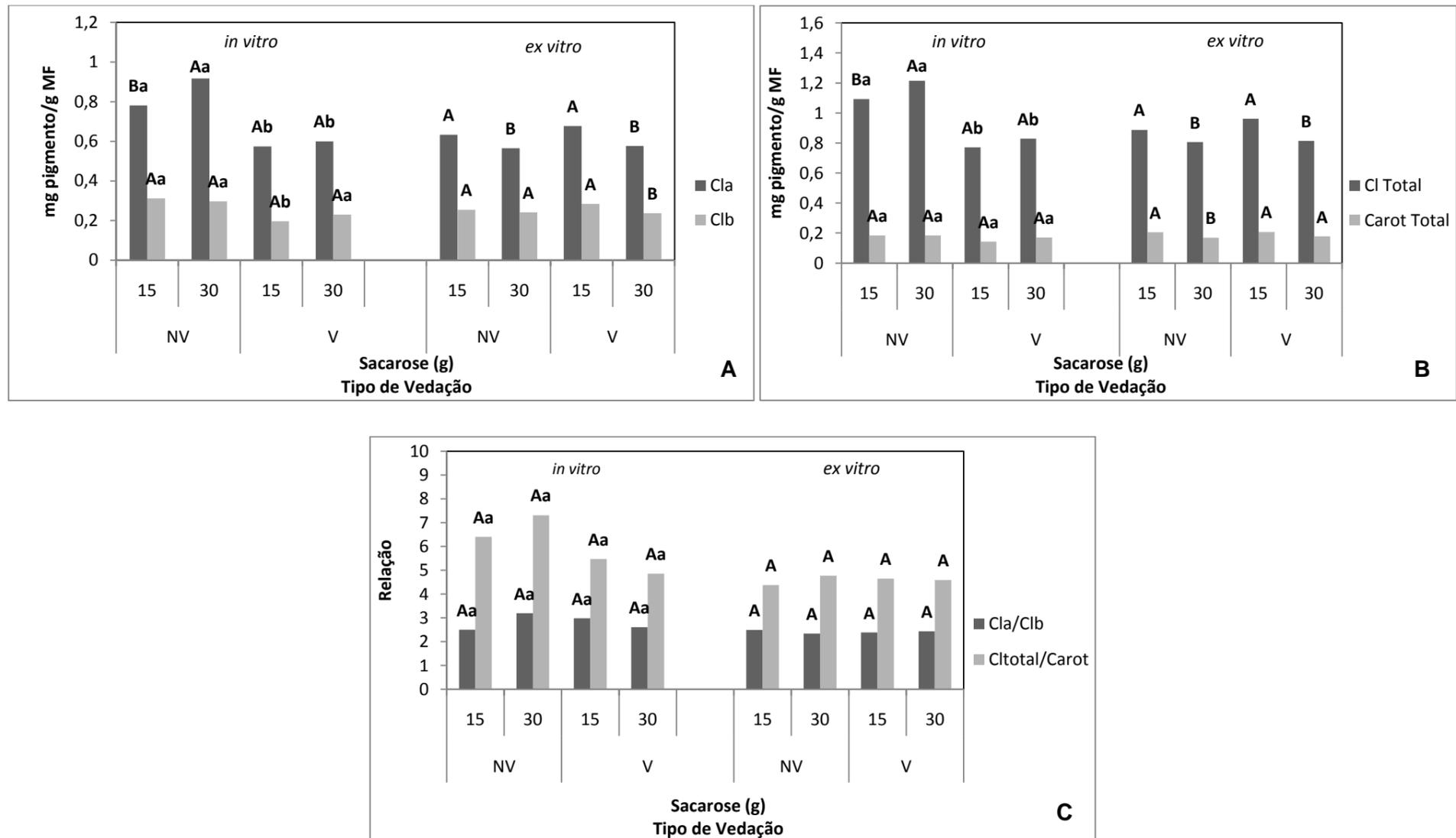


Figura 8. Teores de clorofila a e clorofila b (A), teores de clorofilas e carotenóides totais (B) e relação entre clorofilas a e b e relação entre clorofilas totais e carotenóides totais (C) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* cultivados *in vitro* na presença de ANA e sacarose e *ex vitro*. **NV**= tampas não vedadas, **V** = tampas vedadas. Para cada pigmento e para cada relação, em cada ambiente de cultivo (*in vitro* ou *ex vitro*), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada tipo de vedação) comparam os efeitos da sacarose. As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (para cada concentração de sacarose) comparam o tipo de vedação utilizado *in vitro*. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2. Ensaios de desidratação progressiva e de reidratação

As plantas utilizadas nesses ensaios foram provenientes de meios de cultura contendo GA₃ e tubos de ensaio com tampas vedadas. A única diferença entre elas foi a concentração de sacarose, 15 ou 30 g L⁻¹, utilizada previamente durante a etapa de cultivo *in vitro*. Visualmente, as plantas mantidas na menor concentração de sacarose apresentavam pior desenvolvimento morfológico do que as plantas cultivadas previamente na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose, o que gerou a expectativa de que as plantas cultivadas na concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose fossem mais sensíveis à desidratação.

Inicialmente, as plantas passaram por um processo de desidratação progressiva durante 24, 38 ou 52 dias (Figura 9). Ao final desse processo, as plantas que haviam sido mantidas *in vitro* na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose, apresentaram aparência mais comprometida do que as tratadas previamente com a concentração mais baixa de sacarose (15 g L⁻¹). Suas folhas se mostravam mais secas e enroladas. Ressalta-se, todavia, que as folhas dessas plantas no início do processo de desidratação encontravam-se mais desenvolvidas do que as folhas das plantas mantidas na presença de 15 g L⁻¹ de sacarose, apresentando, portanto, uma maior superfície de desidratação.

No que diz respeito à reidratação, visualmente, todos os tratamentos apresentaram recuperação após 34 dias de nebulização, duas vezes ao dia (Figura 10).

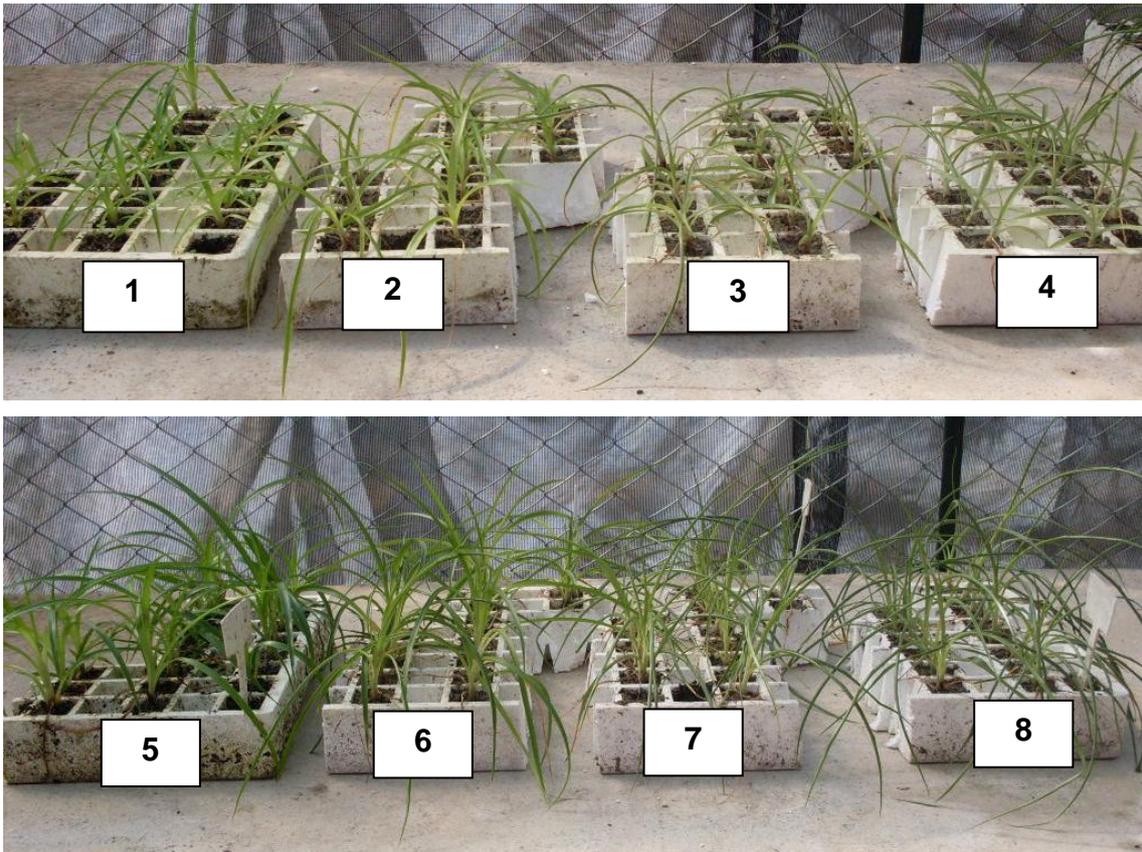


Figura 9. Plantas de *Pitcairnia albiflos* submetidas à desidratção progressiva, sendo os tratamentos 1 ao 4, plantas provenientes de cultura *in vitro* com 15 g L^{-1} de sacarose e tampas vedadas e os tratamentos 5 ao 8, plantas provenientes de cultura *in vitro* com 30 g L^{-1} de sacarose e tampas vedadas. Tratamentos: **1 e 5)** constantemente sob irrigação; **2 e 6)** 24 dias sem irrigação; **3 e 7)** 38 dias sem irrigação e **4 e 8)** 52 dias sem irrigação.

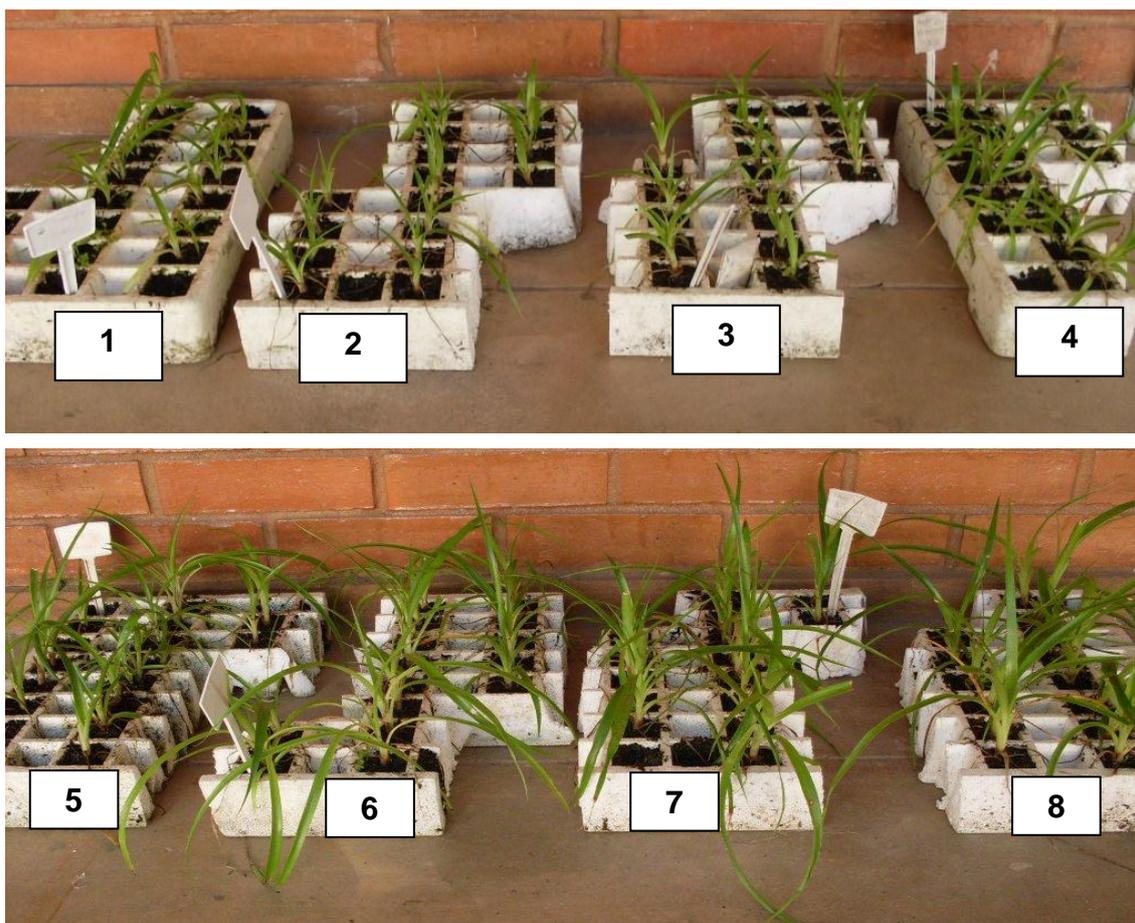


Figura 10. Plantas de *Pitcairnia albiflos* após 34 dias de reidratação, sendo os tratamentos 1 ao 4, plantas provenientes de cultura *in vitro* com 15 g L^{-1} de sacarose e tampas vedadas e os tratamentos 5 ao 8, plantas provenientes de cultura *in vitro* com 30 g L^{-1} de sacarose e tampas vedadas. Tratamentos referentes ao processo de desidratação: **1 e 5)** constantemente sob irrigação; **2 e 6)** 24 dias sem irrigação; **3 e 7)** 38 dias sem irrigação e **4 e 8)** 52 dias sem irrigação.

3.2.1. Prolina

Durante o processo de desidratação, aumentos no acúmulo de prolina foram observados nos tecidos das plantas, independente da concentração de sacarose (15 ou 30 g L^{-1}) utilizada durante a fase de cultivo *in vitro* (Figura 11). Em relação ao controle (plantas mantidas sob irrigação), os aumentos no acúmulo de prolina após 52 dias de desidratação foram de 29,4% e 69,7%, respectivamente, para as plantas oriundas de tratamentos contendo 15 ou 30 g L^{-1} de sacarose. Dessa maneira, observou-se que o acúmulo desse aminoácido foi muito mais acentuado nas plantas cultivadas previamente na concentração mais elevada de sacarose (Figura 11).

Após a reidratação (Figura 11), o perfil de acúmulo de prolina nas plantas oriundas de tratamentos contendo 15 g L⁻¹ de sacarose permaneceu similar ao observado durante a desidratação, embora uma tendência de redução para valores próximos aos obtidos no controle tenha sido observada independente da duração do processo de desidratação. Para as plantas com origem em tratamentos contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, o acúmulo de prolina retornou ao nível do controle, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos, o que evidenciou a recuperação das plantas submetidas ao estresse hídrico.

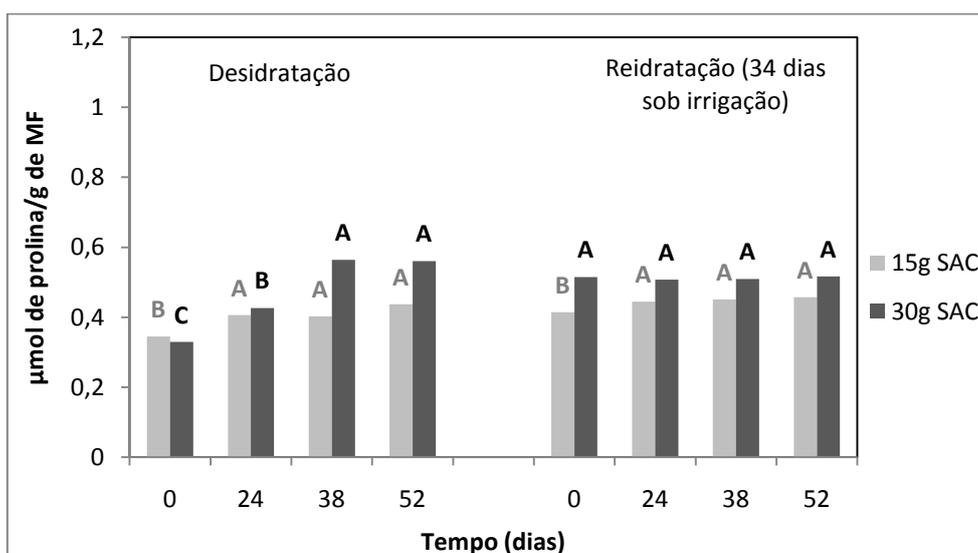


Figura 11. Conteúdo de prolina em tecidos de *Pitcairnia albiflos* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, contendo meios de cultura suplementados com GA₃ e 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose, cultivados *ex vitro* sob condições de estresse hídrico e após a reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2.2. Enzimas do metabolismo antioxidativo (catalase, superóxido dismutase, peroxidase e polifenol oxidase)

Independente da concentração de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹), a atividade da catalase (CAT) reduziu em resposta ao prolongamento do estresse hídrico (Figura 12A). Para as plantas cultivadas *in vitro* com 15 g L⁻¹ de sacarose, houve uma queda de 75% na atividade da CAT do tempo zero (controle – plantas mantidas sob irrigação periódica) até 52 dias de imposição do estresse. Por sua vez, nas plantas

originalmente cultivadas com 30 g L⁻¹ de sacarose e durante o mesmo intervalo de estresse hídrico, a queda na atividade da CAT foi ligeiramente menor (70,4%). Nos dois casos, a diminuição da atividade foi gradual em resposta ao prolongamento do tempo de desidratação, sendo esse decréscimo mais acentuado nos tratamentos provenientes de plantas previamente cultivadas na presença de 15 g L⁻¹ de sacarose (Figura 12A).

Após a reidratação, houve recuperação da atividade da CAT nas plantas que passaram pelo estresse hídrico, nivelando os valores da atividade enzimática aos encontrados nos controles dos tratamentos com 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 12A).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) também diminuiu em relação ao controle, mas não houve uma queda gradual em resposta ao prolongamento do estresse como observado para a CAT. Ainda assim, a queda foi mais acentuada no grupo previamente cultivado *in vitro* com 15 g L⁻¹ de sacarose (Figura 12B). Nesse grupo, a atividade da SOD diminuiu 22,6% nos primeiros 24 dias de estresse hídrico, reduzindo 23,5% do controle ao 52º dia de desidratação. Para os tratamentos utilizando materiais provenientes da concentração mais elevada de sacarose, a queda na atividade da SOD foi de apenas 13,8% do controle até o 52º dia de desidratação (Figura 12B).

Quanto a reidratação, as plantas oriundas da menor concentração de sacarose (15 g L⁻¹) não mostraram recuperação em relação ao controle, mantendo a atividade da SOD próxima à observada durante a desidratação. No grupo de plantas cultivadas anteriormente na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose, a recuperação não ocorreu somente naquelas mantidas por mais tempo sob condições de estresse hídrico (52 dias). As demais mostraram recuperação da atividade enzimática próxima ao controle (Figura 12B).

As plantas provenientes de tratamentos com 15 g L⁻¹ de sacarose apresentaram um decréscimo intenso na atividade da peroxidase (POD) até o 38º dia de estresse hídrico, mas, após esse período, houve estabilização da atividade enzimática (Figura 12C). Nesse material, a queda na atividade da POD foi mais acentuada do que no grupo cultivado previamente com 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo a redução na atividade enzimática de 65% do controle até o 38º dia de desidratação (Figura 12C). No grupo de plantas cultivadas previamente com a concentração mais elevada de sacarose, não houve diferença significativa do controle ao 24º dia de estresse, mas a partir do 38º dia houve uma queda de 28,5% na atividade da POD em relação ao controle e essa diferença se manteve até o 52º dia de estresse (Figura 12C).

No material proveniente de meio de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose, após a reidratação, houve recuperação da atividade da POD nas plantas submetidas a 38 e 52 dias de estresse, cujas atividades enzimáticas se igualaram à atividade observada no 24º dia de estresse. Todavia, não houve recuperação dessas plantas em relação ao controle (Figura 12C). Nas plantas cultivadas previamente em meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, as diferenças foram mantidas com um leve aumento na atividade da POD aos 38 e 52 dias de estresse, mas nada que levasse a uma recuperação de fato (Figura 12C). Nas plantas submetidas a 24 dias de estresse, a atividade da POD não diferiu em relação ao controle nem durante a imposição do estresse e tampouco durante a reidratação.

A atividade da polifenol oxidase (PPO) apresentou queda nas plantas provenientes de meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose. Essa queda foi mais acentuada do controle ao 24º dia de desidratação (32,6%), alcançando, em relação ao controle, 36,1% no 52º dia (Figura 12D). Em contraste, as plantas cultivadas com 30 g L⁻¹ de sacarose não apresentaram alterações significativas na atividade da PPO durante todo o intervalo de estresse hídrico (Figura 12D).

Após a reidratação, o comportamento foi similar ao observado durante a desidratação. No material proveniente da menor concentração de sacarose, as plantas que haviam sido submetidas ao estresse hídrico não chegaram a se recuperar em relação ao controle, mas se mantiveram estáveis com um aumento médio de 22,5% na atividade da PPO em relação ao encontrado durante a imposição do estresse (Figura 12D). As plantas oriundas de meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose mantiveram a atividade da PPO no mesmo nível que o encontrado durante a desidratação, apresentando um aumento médio aproximado de 6% na atividade enzimática, embora sem diferenças significativas durante o período de estresse hídrico (Figura 12D).

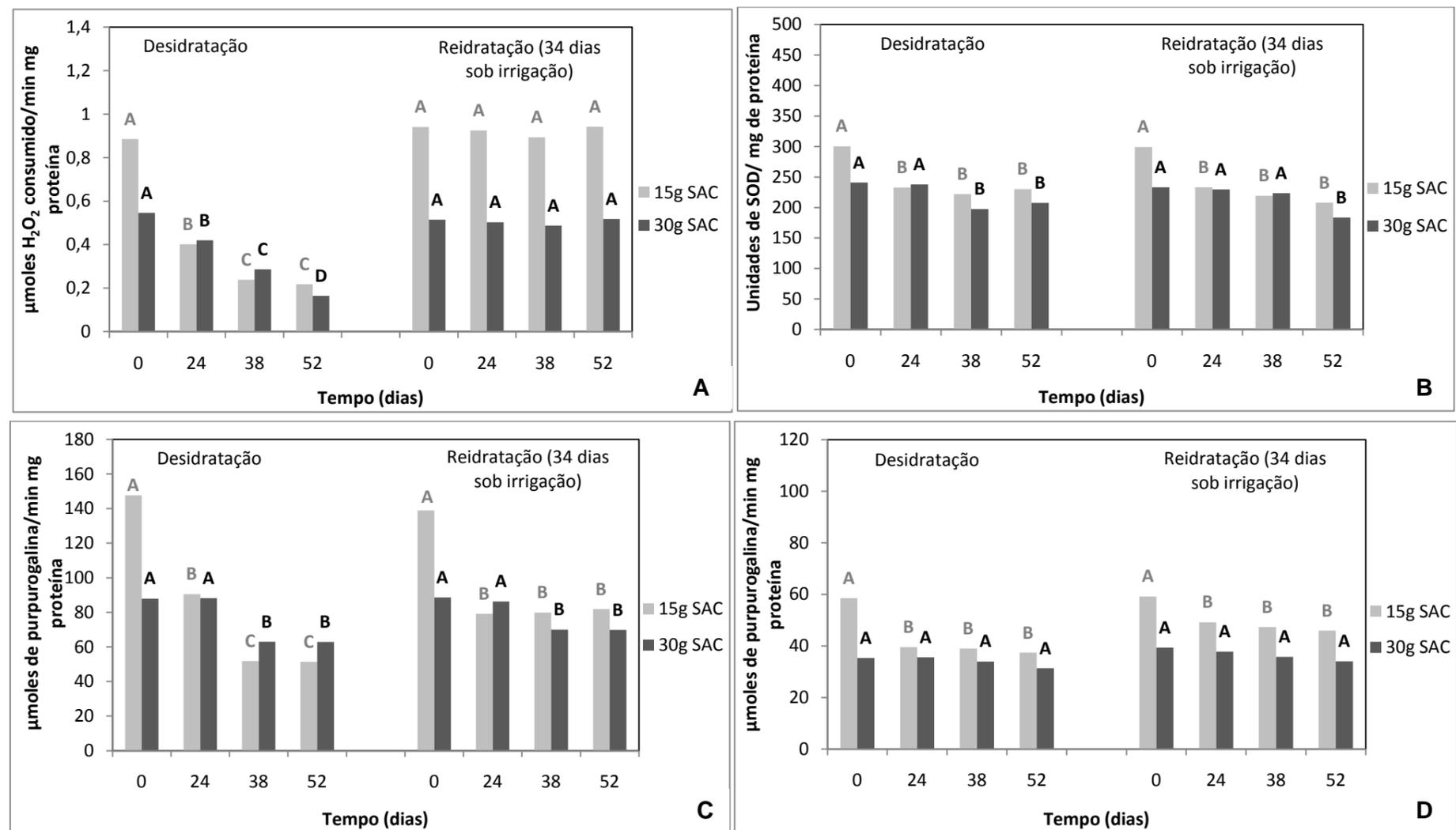


Figura 12. Atividades da catalase (CAT) (A), da superóxido dismutase (SOD) (B), da peroxidase (POD) (C) e da polifenol oxidase (PPO) (D) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* provenientes de meios de cultura contendo GA_3 , tubos de ensaio com tampas vedadas e duas concentrações de sacarose, cultivados *ex vitro* sob condições de estresse hídrico e após a reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

3.2.3. Pigmentos

Sob condições de estresse hídrico, os teores das clorofilas *a* e *b* aumentaram em resposta ao prolongamento do estresse, independente da concentração de sacarose utilizada previamente nos meios de cultura. Todavia, esse aumento não foi estatisticamente significativo até o 52º dia de desidratação (Figura 13A). O teor de clorofila *a* apresentou um aumento de 31,8% do controle ao 52º dia de estresse hídrico nas plantas provenientes de meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose. Para as plantas oriundas de meios contendo 30 g L⁻¹ de sacarose esse aumento foi ligeiramente maior (33,3%). Em relação ao conteúdo de clorofila *b*, o comportamento foi similar, sendo os aumentos de 25% e 41,2%, respectivamente, para a menor e maior concentração de sacarose, do controle ao último dia de estresse.

Durante a reidratação, os teores das clorofilas *a* e *b* diminuíram um pouco quando comparados com os observados durante a desidratação. Pôde-se perceber que houve recuperação das plantas em relação ao controle, uma vez que os teores das clorofilas no estágio mais avançado de desidratação se igualaram ao do controle (Figura 14A).

Os teores de clorofilas totais não apresentaram diferenças significativas durante o período de desidratação para nenhuma das concentrações de sacarose. Porém, observaram-se aumentos nos teores de clorofilas totais em ambas as concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) (Figura 13B). Os aumentos do controle ao 52º dia foram de 26,5% e 35,8%, respectivamente, para a menor e a maior concentração de sacarose.

Os teores de carotenóides totais apresentaram diferenças significativas durante a desidratação somente nas plantas provenientes de meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose, sendo os aumentos no 38º dia de desidratação de 71,4% em relação ao controle (Figura 13B). Em contraste, plantas provenientes de meio de cultura contendo a concentração mais elevada de sacarose não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle até o 52º dia de estresse hídrico (Figura 13B). Durante a reidratação, as plantas se recuperaram em relação ao controle, embora também não tenham apresentado diferenças significativas entre os intervalos de desidratação (figura 14B).

A relação entre as clorofilas *a/b* e a relação entre as clorofilas totais/carotenóides totais não apresentaram diferenças significativas sob condições de estresse hídrico para nenhum dos períodos de desidratação e para nenhuma das concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) (Figura 13C). O mesmo pôde ser observado na etapa de reidratação, onde não foi observada nenhuma diferença

significativa entre os períodos e as concentrações de sacarose utilizadas. Nesse caso, a relação entre clorofilas *a* e *b* apresentou um aumento médio de 42,3% e 28,5% para as plantas provenientes de meio de cultura tratados com 15 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹ de sacarose respectivamente, em comparação com a etapa de desidratação; já a relação entre clorofilas totais e carotenóides totais apresentou redução média de 13,1% e 14,7% para as plantas provenientes de meios de cultura tratados com 15 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹ de sacarose respectivamente, quando comparado com os resultados da etapa de desidratação (Figura 14C).

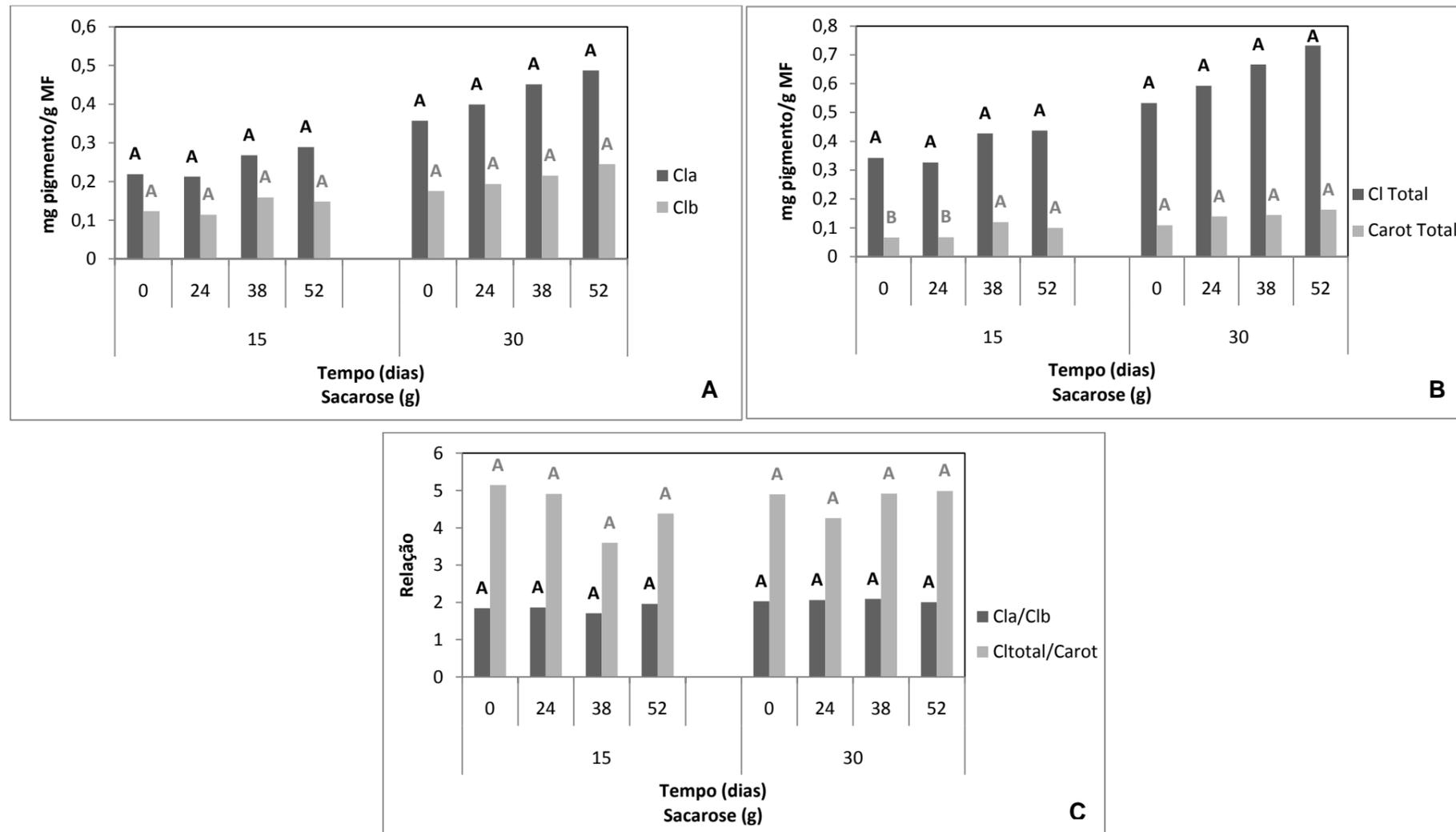


Figura 13. Teores de clorofila *a* e clorofila *b* (A), teores de clorofilas totais e carotenóides totais (B) e relação entre clorofilas *a* e *b* e relação entre clorofilas totais e carotenóides totais (C) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* provenientes de meios de cultura contendo GA₃, tubos de ensaio com tampas vedadas e duas concentrações de sacarose, cultivados *ex vitro* sob condições de estresse hídrico. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

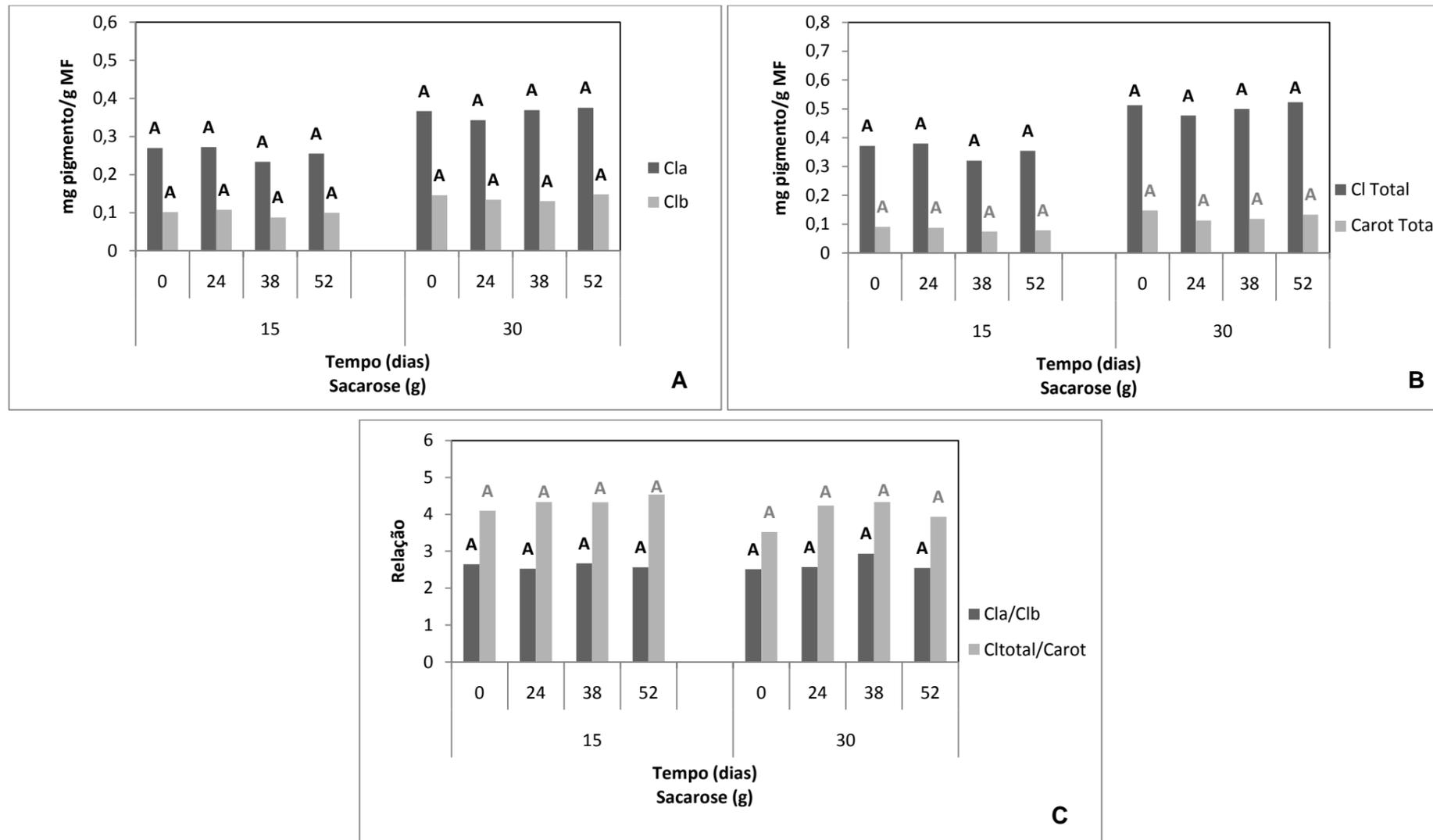


Figura 14. Teores de clorofila *a* e clorofila *b* (A), teores de clorofilas totais e carotenóides totais (B) e relação entre clorofilas *a* e *b* e relação entre clorofilas totais e carotenóides totais (C) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* provenientes de meios de cultura contendo GA₃, tubos de ensaio com tampas vedadas e duas concentrações de sacarose, cultivados *ex vitro* após a reidratação (34 dias). As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2.4. Carboidratos

Os teores de carboidratos solúveis totais (CST) aumentaram com o prolongamento do estresse hídrico, independente da origem das plantas (Figura 15A). Esses aumentos foram em média, 77,8% e 100%, respectivamente, para as plantas com origem em 15 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹ de sacarose, do controle ao 52º dia de desidratação (Figura 15A). Comportamento semelhante foi observado para os teores de sacarose e açúcares redutores (Figuras 15B e 15C). Para a sacarose, o aumento mais acentuado se deu nas plantas com origem na concentração mais elevada de sacarose (100% de aumento) (Figura 15B). Já as plantas com origem na menor concentração de sacarose apresentaram aumento no teor de sacarose de 50% até o final da etapa de desidratação (Figura 15B). Para os açúcares redutores, houve diferença significativa na menor concentração de sacarose (15 g L⁻¹), sendo o aumento, do controle ao final do estresse hídrico de mais de 100%, o que não foi registrado para as plantas com origem na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo seu aumento até o término do estresse de apenas 14,3% (Figura 15C).

Em contraste ao observado para CST e sacarose, o teor de amido decresceu durante a imposição do estresse hídrico, independente da origem das plantas (Figura 15D). A queda foi mais acentuada para as plantas provenientes de meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose, sendo de 30,4% no último dia de estresse. Para a maior concentração de sacarose, essa diminuição do teor de amido ficou em torno de 20%.

A recuperação das plantas durante a reidratação foi observada para CST, sacarose e amido, uma vez que as plantas que sofreram o estresse hídrico tiveram os níveis de seus carboidratos próximos aos dos seus respectivos controles após o período de reidratação (Figuras 15A, 15B e 15D). Essa recuperação somente não foi observada para os açúcares redutores, que independente da origem das plantas, ainda apresentaram diferenças significativas em resposta aos períodos de desidratação (figura 15C).

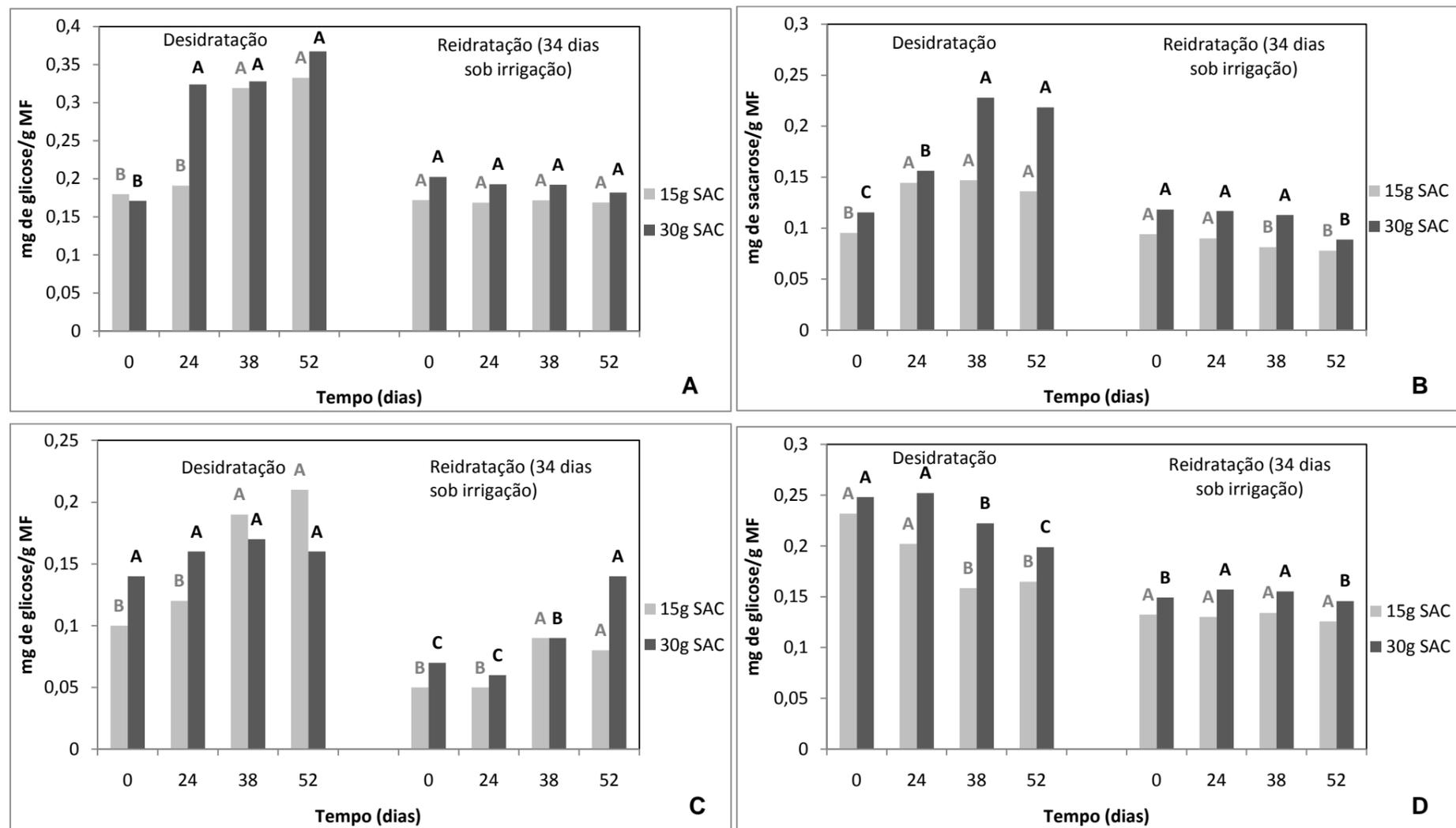


Figura 15. Teores de carboidratos solúveis totais (CST) (A), sacarose (B), açúcares redutores (C) e amido (D) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* provenientes de meios de cultura contendo GA₃, tubos de ensaio com tampas vedadas e duas concentrações de sacarose, cultivados *ex vitro* sob condições de estresse hídrico e reidratação (34 dias). Em cada condição (desidratação ou reidratação), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2.5. Conteúdo relativo de água e suculência foliar

Os conteúdos relativos de água (CRA) reduziram com a imposição do estresse hídrico, independente da origem das plantas (Figura 16). A queda para as plantas provenientes de meios contendo 15 g L⁻¹ de sacarose foi de 45,9% do início ao 52º dia de desidratação. Para as plantas com origem em meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, o decréscimo foi um pouco mais acentuado, sendo 49,8% do início ao último dia de estresse. Comportamento semelhante, porém bem menos intenso, foi observado para a suculência das folhas (Figura 17). A queda foi de 13,5% e 19,6%, respectivamente, para plantas provenientes da menor e da maior concentração de sacarose, do início ao último dia de estresse.

Após a reidratação, a recuperação em relação ao controle foi verificada para o CRA (Figura 16). Para a suculência, verificaram-se aumentos de 28,3% e 46,9%, respectivamente, para as plantas oriundas da menor e maior concentração de sacarose após a reidratação (Figura 17).

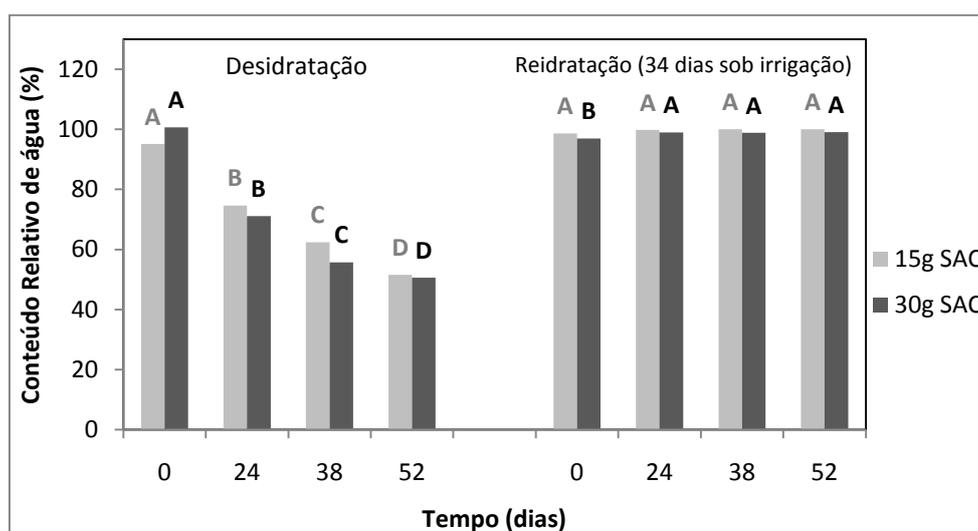


Figura 16. Conteúdos relativos de água (CRA) em tecidos de *Pitcairnia albiflos* provenientes de meios de cultura contendo GA₃, tubos de ensaio com tampas vedadas e duas concentrações de sacarose, cultivados *ex vitro* sob condições de estresse hídrico e reidratação (34 dias). Em cada condição (desidratação ou reidratação), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

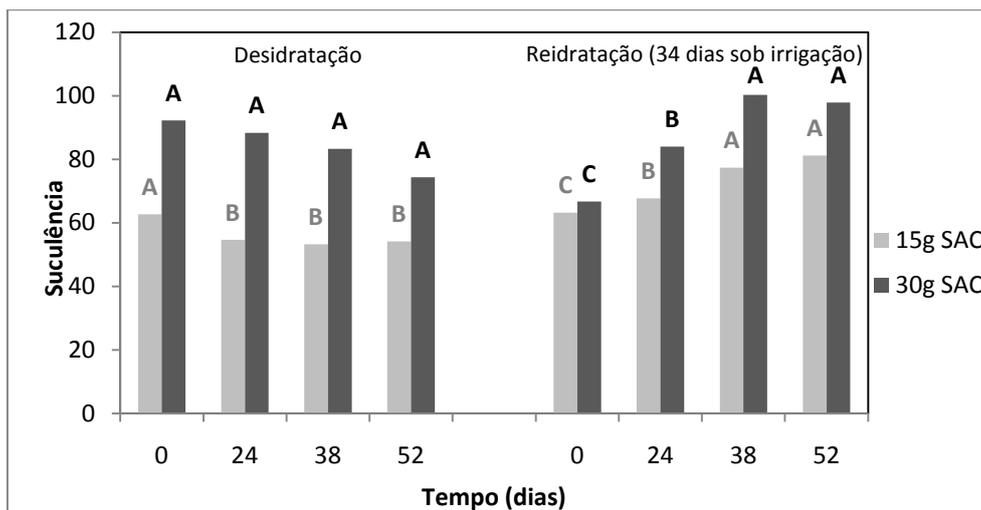


Figura 17. Suculência em tecidos de *Pitcairnia albiflos* provenientes de meios de cultura contendo GA₃, tubos de ensaio com tampas vedadas e duas concentrações de sacarose, cultivados *ex vitro* sob condições de estresse hídrico e reidratação (34 dias). Em cada condição (desidratação ou reidratação), as médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As médias seguidas por mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

A prolina é uma das substâncias mais importantes relacionadas à proteção celular contra os efeitos prejudiciais do déficit hídrico, atuando no ajustamento osmótico, na desintoxicação das ROS, na proteção da integridade das membranas, como componente de proteínas da parede celular, como tampão redox potencial e no aumento da tolerância das plantas aos danos causados em condições de estresses ambientais (Molinari *et al.*, 2007).

O conteúdo de prolina nas plantas, tanto nas mantidas *in vitro* quanto nas *ex vitro*, foi maior nas concentrações mais elevadas de sacarose (30 g L⁻¹), independente do tipo de vedação (tampas vedadas ou não vedadas) e do regulador de crescimento utilizado no meio de cultura (GA₃ ou ANA) (Figuras 4A e 4B), o que pode ser atribuído à influência direta da sacarose sobre a biossíntese desse aminoácido (Al-Khayri e Al-Bahrani, 2002; Mohammadkhani e Heidari, 2008). A prolina apresenta função osmoprotetora importante. Meios de cultura suplementados com concentrações mais elevadas de sacarose apresentam maior pressão osmótica, o que contribui para que as plantas acumulem solutos orgânicos e inorgânicos nas células, diminuindo o potencial osmótico. Esse ajustamento osmótico reduz o potencial hídrico foliar, tornando-o mais negativo, favorecendo a manutenção da absorção de água e, conseqüentemente, a turgescência celular, o que também é observado em condições de déficit hídrico, situação pela qual as plantas passam durante a aclimatização, etapa esta em que elas ficam mais susceptíveis devido às variações na umidade do ambiente de cultivo (Hartman *et al.*, 2002; Cavalcante *et al.*, 2009). A prolina também desempenha importante função contra os danos causados pelo estresse oxidativo, podendo atuar na remoção do oxigênio “singlet” (¹O₂) e do radical hidroxila (·OH), sendo por isso capaz de estabilizar unidades funcionais como as membranas, proteínas e enzimas em condições de estresse (Molinari *et al.*, 2007; Campos, 2009). Pré-tratamentos com prolina exógena em *Solanum nigrum* melhoraram a tolerância ao cádmio, o que foi correlacionado com o aumento da atividade da SOD e da CAT, além do aumento dos conteúdos da glutathione total, que são moléculas antioxidantes relacionadas à dissipação das espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células (Xu *et al.*, 2009).

Devido às funções protetoras da prolina, pode-se supor que as plantas tratadas com a menor concentração de sacarose (15 g L⁻¹) encontravam-se mais susceptíveis a condições de estresse uma vez que apresentaram menor acúmulo desse aminoácido. Com o incremento do déficit hídrico, foi possível observar o aumento gradual no acúmulo de prolina durante o período de estresse, sendo esse acúmulo mais

acentuado nas plantas com origem em tratamentos contendo 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 11). Esse comportamento pode indicar melhor resposta ao estresse hídrico, uma vez que essas plantas parecem ter respondido com maior eficiência do que as que foram tratadas *in vitro* com 15 g L⁻¹ de sacarose, apresentando mecanismos de ajustamento osmótico e de proteção celular contra as ROS que são formadas em situação de estresse. Segundo Molinari *et al.*, (2007), o acúmulo de prolina sob condições de estresse hídrico apresenta grande importância como componente do sistema antioxidativo. No que diz respeito ao acúmulo de prolina após a reidratação das plantas, foi observada recuperação, uma vez que os conteúdos de prolina alcançaram valores próximos aos dos controles mantidos constantemente sob irrigação periódica (Figura 11).

Os resultados encontrados no presente trabalho evidenciam que a prolina apresenta importante papel, tanto em condições de cultivo *in vitro*, nas quais as plantas se encontram em constante condição de estresse, como *ex vitro*, em que o processo de aclimatização também submete as plantas a mudanças ambientais e a diferentes estresses abióticos, especialmente o hídrico, resultando na geração de ROS e na necessidade de eliminação desses radicais. A hiperidricidade é caracterizada por modificações morfológicas facilmente reconhecíveis nas plantas pela ocorrência de tecidos translúcidos e quebradiços, que resultam em desordens fisiológicas severas (Saher *et al.*, 2005). Essas desordens são resultantes do aumento do estresse oxidativo, uma das principais consequências da hiperidricidade, que se manifesta pelo aumento na peroxidação de lipídios e na atividade de diversas enzimas (Saher *et al.*, 2005), o que reforça a importância metabólica das moléculas de prolina.

Nos ensaios realizados com materiais mantidos *in vitro*, as atividades da catalase (CAT), peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO) foram maiores nos tubos de ensaio com tampas vedadas, onde a umidade relativa do ar encontra-se próxima a 100%, favorecendo a ocorrência de hiperidricidade, cuja intensidade pode ser influenciada, dentre outros fatores, pelo tipo de regulador de crescimento adicionado ao meio de cultura (Figuras 5A, 5C, 5D, 6A, 6C e 6D). Nos tratamentos com 30 g L⁻¹ de sacarose e tampas vedadas houve tendência de redução na atividade enzimática, com exceção da catalase. Esse comportamento sugere a ocorrência de estresse oxidativo nos tecidos mantidos em tubos de ensaio sem ventilação (Chakrabarty *et al.*, 2005; Dewir *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; Gupta e Prasad, 2010). A atividade dessas enzimas foi mais elevada nas plantas cultivadas em meio de cultura contendo GA₃ do que nas tratadas com ANA, com exceção da PPO. Já para a superóxido dismutase (SOD), a atividade não diferiu quanto ao tipo de vedação, apresentando atividade mais

elevada também em plantas cultivadas em meio de cultura com GA₃ (Figuras 5B e 6B). Para essa enzima, diferenças significativas foram observadas apenas em relação às concentrações de sacarose, sendo a sua atividade menor nos materiais cultivados em presença de GA₃ e em tubos com tampas não vedadas. Influências tanto positivas (Van Den Ende e Valluru, 2009) quanto negativas (Ślesak *et al.*, 2006) da sacarose sobre a atividade da SOD são relatadas na literatura.

O radical superóxido (O₂⁻) e os seus derivados, radical hidroxila (·OH) e oxigênio "singlet" (¹O₂), são, reconhecidamente, os principais causadores de danos peroxidativos aos componentes celulares. Os radicais O₂⁻ transformam-se espontaneamente em H₂O₂, porém a reação é muito mais efetiva se for catalisada pela superóxido dismutase (SOD). A ação conjunta da SOD e da catalase (CAT) reduz o risco da formação do radical hidroxila (·OH), espécie química de elevada reatividade. Entretanto, o H₂O₂ produzido representa outra espécie potencialmente tóxica que deve ser da mesma forma, rapidamente eliminada do metabolismo (Foyer *et al.*, 1994). A ação combinada da SOD, da CAT e de PODs de diversos tipos na presença de substâncias antioxidantes pode efetivamente eliminar, dissipar e, ou, imobilizar espécies tóxicas de oxigênio (Scandalios, 1993). Portanto, a atividade conjunta dessas e de outras enzimas relacionadas ao metabolismo antioxidativo pode indicar o nível de estresse e a capacidade de tolerância e de adaptação das plantas às condições de cultivo *ex vitro*.

A transferência das plantas das condições de cultivo *in vitro* para o crescimento *ex vitro* é limitada pelo déficit hídrico (Girardi e Pescador, 2010), que estimula a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Para ter sucesso na transferência das plantas para condições *ex vitro*, conteúdos suficientes de antioxidantes não-enzimáticos, ascorbato e glutatona, principalmente, e a atividade enzimática antioxidativa durante a etapa de crescimento *in vitro* são fundamentais (Bařková *et al.*, 2008).

Nas plantas aclimatizadas em casa de vegetação, em geral, as atividades das CAT, SOD, POD e PPO se mostraram mais baixas ou sem diferenças significativas nas plantas oriundas de meios de cultura com a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose em comparação à concentração mais baixa desse carboidrato (15 g L⁻¹) (Figuras 5C, 5D, 6A, 6B, 6C e 6D). Exceção foi verificada para a atividade da CAT nas plantas que foram cultivadas em meio de cultura contendo GA₃, 30 g L⁻¹ de sacarose e tampas vedadas. Nesse caso, a atividade enzimática foi mais alta e apresentou diferença significativa em comparação à concentração mais baixa de sacarose (Figura 5A). Nessa espécie, o tipo de tampa utilizada parece não ter influenciado tão intensamente a atividade das enzimas (CAT, SOD, POD e PPO) durante a aclimatização. Em

contraste, a sacarose adicionada ao meio de cultura parece ter causado maior efeito residual, sendo que, em geral, plantas provenientes de meios de cultura adicionados de 30 g L⁻¹ de sacarose apresentaram melhor desenvolvimento em condições *ex vitro*.

Com o prolongamento do estresse hídrico, as atividades da CAT, SOD, POD e PPO diminuíram ao longo do tempo, sendo que nas plantas que receberam 15 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura durante a etapa de cultivo *in vitro*, a queda nas atividades enzimáticas foi bem mais pronunciada, o que pode indicar que esses materiais são mais sensíveis ao estresse hídrico (Figuras 12A, 12B, 12C e 12D). Na literatura, diversos trabalhos evidenciaram queda na atividade de enzimas antioxidantes quando as plantas são submetidas a condições de estresses abióticos, como o déficit hídrico e estresses causados por metais pesados (Panda e Choudhury, 2005; Aragón *et al.*, 2010).

Após a reidratação, nem todas as atividades enzimáticas das plantas que passaram pelo estresse hídrico apresentaram recuperação em relação aos controles. As atividades da CAT, SOD, POD e PPO mostraram melhor recuperação em relação aos controles nas plantas provenientes de meios de cultura com 30 g L⁻¹ de sacarose (Figuras 12A, 12B, 12C e 12D), o que sugere que essas plantas mantiveram seu sistema antioxidativo mais ativo, mostrando maior tolerância à escassez de água, embora nem sempre tenha sido possível a recuperação total da atividade enzimática para as plantas que passaram por períodos mais prolongados de estresse (52 dias), como no caso da SOD e da POD (Figuras 12B e 12C). Plantas com origem em meios de cultura suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose também conseguiram se recuperar, mas nem sempre em relação aos níveis dos controles, sendo as atividades da SOD e da POD recuperadas somente em comparação àquelas submetidas ao menor tempo de estresse (24 dias) (Figuras 12B e 12C). A capacidade de recuperação das plantas após períodos de déficit hídrico é relatada, por exemplo, em plantas de citrumelelo “Swingle” submetidas a curtos períodos de estresse hídrico (16 dias). Após 24 horas de reidratação, as atividades da SOD e CAT que durante o estresse tiveram suas atividades aumentadas, sofreram redução (Campos, 2009). Em um estudo com sementes de algodão, outros componentes como carotenóides, clorofilas, conteúdos de proteínas, prolina dentre outros, também recuperaram seus níveis normais após reidratação posterior a períodos de seca (Parida *et al.*, 2007).

Segundo Gour *et al.* (2007), um dos parâmetros mais eficientes para a determinação do estágio adequado do endurecimento é o conteúdo de clorofilas. Quando o conteúdo de clorofilas em plantas oriundas de cultivo *in vitro* alcança 95% dos valores encontrados em plantas mantidas em ambiente natural elas podem ser

consideradas suficientemente endurecidas para sobreviverem em condições de campo.

Uma pré-adaptação à condição autotrófica pode ser estimulada nas plantas ainda *in vitro*. Para isso, pode-se reduzir ou eliminar a fonte de açúcar no meio de enraizamento e aumentar a concentração de CO₂ e a intensidade luminosa no ambiente de incubação, dando condições à planta para realizar a fotossíntese (Zobayed *et al.* 2004; Kozai, 2010; Xiao *et al.*, 2011). Outro grupo de pigmentos fotossintéticos de grande importância é o dos carotenóides, pois eles apresentam função fotoprotetora do aparelho fotossintético e antioxidante, evitando a formação do oxigênio “singlet” (¹O₂) no complexo antena do fotossistema II, da cadeia transportadora de elétrons, nos cloroplastos (Campos, 2009).

Na análise realizada com materiais mantidos *in vitro*, as plantas cultivadas em tubos de ensaio com tampas vedadas apresentaram menor acúmulo de pigmentos da fotossíntese (clorofilas *a* e *b*, clorofilas e carotenóides totais) do que em tubos com tampas não vedadas, sendo que essa diferença foi mais pronunciada nos tratamentos com ANA (Figuras 7A, 7B, 8A e 8B). Nos tubos com tampas vedadas, o acúmulo desses pigmentos foi ainda menor nas plantas cultivadas com 15 g L⁻¹ de sacarose (Figuras 7B, 7C, 8A e 8B). Esse comportamento, aparentemente, pode estar associado ao desenvolvimento de hiperidricidade nos tecidos das plantas cultivadas em tubos com tampas vedadas e com 15 g L⁻¹ de sacarose, uma vez que nessas condições a pressão osmótica é baixa, favorecendo o acúmulo de água nos tecidos.

Segundo Saher *et al.* (2004) e Sreedhar *et al.* (2009), em experimentos em que a hiperidricidade é induzida pela redução da concentração de ágar adicionada ao meio de cultura, o conteúdo de clorofilas é marcadamente reduzido, o que coincide com os resultados encontrados no presente trabalho. Na concentração mais elevada de sacarose (30 g L⁻¹), o acúmulo de pigmentos da fotossíntese não variou em resposta ao tipo de vedação utilizado. Provavelmente, o aumento na pressão osmótica dos meios de cultura com essa concentração de sacarose pode ter contribuído para evitar a hiperidricidade, mesmo nos tubos de ensaio onde foram utilizadas tampas vedadas. No entanto, sabe-se que a ventilação nos tubos de ensaio reduz a ocorrência de hiperidricidade (Ivanova e Van Staden, 2010).

No processo de aclimatização, as plantas passam de uma condição heterotrófica, na qual elas dependem de um suprimento externo de energia (sacarose do meio) para um estado autotrófico, no qual elas precisam realizar fotossíntese para sobreviver. Em função disso, quanto mais rapidamente elas alcançam níveis adequados de pigmentos, maior será a sobrevivência ao transplântio. Após a aclimatização, plantas provenientes de meios de cultura contendo GA₃ e na maior

concentração de sacarose, apresentaram maior acúmulo de pigmentos fotossintéticos (Figuras 7A e 7B), ao contrário do verificado para as plantas provenientes de meios de cultura contendo ANA, em que os maiores acúmulos de pigmentos fotossintéticos foram observados na menor concentração de sacarose (Figuras 8A e 8B). Embora existam diversos relatos de efeitos prejudiciais da sacarose sobre a biossíntese de pigmentos da fotossíntese (Kaul e Sabharwal, 1971; Van Huylbroeck e Debergh, 1996), no presente trabalho não foi possível estabelecer uma resposta direta e mais evidente da ação desse carboidrato, o que possivelmente pode ser decorrente da faixa de concentração relativamente baixa utilizada. Embora as relações Cl_a/Cl_b e clorofilas totais/carotenóides totais sejam utilizadas como parâmetros de indicação da ocorrência de diferentes estresses ambientais, no presente estudo elas não discriminaram qualquer um dos tratamentos (Figuras 7C e 8C).

No presente trabalho, plantas que passaram por estresse hídrico, independente da concentração de sacarose utilizada *in vitro*, não apresentaram diferenças significativas no acúmulo de pigmentos da fotossíntese (Figuras 13A e 13B). Resultados similares ocorreram para plantas de pepino submetidas ao estresse pelo frio (Feng *et al.*, 2003). Em parte da literatura, plantas sob ação de estresses abióticos induzidos por metais, pelo déficit hídrico ou pelo aumento da salinidade tiveram os conteúdos de pigmentos fotossintéticos reduzidos em resposta ao prolongamento e, ou, incremento do tempo ou nível de estresse (Lima *et al.*, 2004; Erturk *et al.*, 2007; Parida *et al.*, 2007; Kummerová *et al.*, 2010), o que contrasta com os resultados encontrados no presente trabalho. As relações Cl_a/Cl_b e clorofilas totais/carotenóides totais também não discriminaram nenhum dos tratamentos (Figura 13C).

Após a reidratação das plantas que passaram pelo estresse hídrico, os conteúdos de Cl_a , Cl_b , clorofilas totais e carotenóides totais, assim como as relações Cl_a/Cl_b e clorofilas totais/carotenóides totais, retornaram ao nível dos controles mantidos constantemente irrigados (Figuras 14A, 14B e 14C).

Os carboidratos, assim como outros solutos orgânicos são acumulados nas células em resposta a diferentes tipos de estresse com a finalidade principal de regulação osmótica, favorecendo a manutenção do turgor celular. Durante a aclimatização, entre outros processos, os carboidratos ainda têm função de fornecer energia às células e esqueletos de carbono para a síntese de outros compostos celulares (Maia *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Girardi e Pescador, 2010). No presente trabalho, houve acúmulo gradual de carboidratos solúveis totais, sacarose e açúcares redutores (Figuras 15A, 15B e 15C) em resposta ao prolongamento do estresse, o que corrobora com os resultados encontrados na literatura para aclimatização de gengibre após o cultivo *in vitro* (Girardi e Pescador, 2010), assim como para duas cultivares de

milho submetidas ao estresse hídrico (Maia *et al.*, 2007) e para três genótipos de *Vigna aconitifolia* sob déficit hídrico (Garg *et al.*, 2001). Ao contrário do comportamento observado para os carboidratos solúveis totais, os teores de amido (Figura 15D) reduziram durante o período de imposição do estresse, o que concorda com resultados encontrados por Garg *et al.* (2001) em experimento com *Vigna aconitifolia* e com Girardi e Pescador (2010), durante etapa de aclimatização de *Zingiber officinale*, etapa essa em que as plantas podem sofrer com estresse hídrico durante a transferência das plantas para o campo. Em condições de estresse hídrico, o amido é degradado nos tecidos de armazenamento, havendo redução nos teores do mesmo ou a sua quebra e transferência para o citossol na forma de carboidratos solúveis, como a sacarose e sorbitol (Carvalho e Zanette, 2004).

O conteúdo relativo de água (Figura 16) também sofreu decréscimos em resposta à imposição e prolongamento do estresse hídrico, apresentando uma queda aproximada de 50% nos últimos dias de estresse em relação ao controle, o que coincide com os resultados encontrados por Garg *et al.* (2001) em experimentos com *Vigna aconitifolia* e os encontrados por Kocheva *et al.* (2005) em experimento em que o estresse hídrico foi induzido pelo uso de polietileno glicol (PEG) em plantas de *Hordeum vulgare*. A queda entre a relação do peso de matéria fresca e o peso de matéria fresca máxima está relacionada com a perda gradual de água na planta com o prolongamento do estresse hídrico. Assim, como a relação é expressa por uma divisão de valores onde o peso de matéria fresca máxima (maior valor) é usado como denominador, e o numerador que é o peso de matéria fresca tende à diminuição devido à perda de água pela planta durante o estresse hídrico, essa relação apresenta resultados menores, indicando que a planta está armazenando baixos conteúdos de água, pois a sua capacidade total de armazenamento é bem maior. Essa relação comprova que a planta sofre injúrias devido à falta de água no ambiente, e que o seu organismo responde diminuindo a capacidade de armazenamento de água em seus tecidos (Mantovani, 1999).

Geralmente, as bromélias são referidas como plantas suculentas, possuindo folhas espessas, com grande capacidade de retenção e armazenamento de água. A capacidade de retenção de água em células especializadas (hidrênquima) favorece a sobrevivência das plantas em condições de impossibilidade de absorção de água em períodos de seca e estresse hídrico, deslocando a água e solutos dessas células para o clorênquima, mantendo a atividade fotossintética ativa (Lobo, 2007). Assim, podemos relacionar a suculência foliar com a espessura das folhas e a capacidade de retenção e armazenamento de água. No presente trabalho, durante o estresse hídrico, os maiores índices de suculência foram encontrados nas plantas provenientes de

meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, não havendo diferenças significativas com o prolongamento do estresse (Figura 17). Já para as plantas provenientes de meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose, houve diferença significativa apenas do controle ao 24^o dia de estresse com posterior manutenção do nível de suculência até o fim do estresse (Figura 17). Após a reidratação, a suculência nas plantas provenientes de meios de cultura contendo a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose permaneceu mais elevada em comparação com a concentração mais baixa desse carboidrato. Os níveis de suculência chegaram a ultrapassar os valores encontrados nos controles, apresentando diferenças significativas para as plantas oriundas de meios de cultura contendo as duas concentrações de sacarose (Figura 17). Isso evidencia que plantas de *Pitcairnia albiflos*, principalmente, quando cultivadas em meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, mantêm capacidade de retenção e armazenamento de água mesmo após períodos prolongados de déficit de água.

Após a reidratação, os teores de carboidratos solúveis totais (CST), sacarose, amido e o conteúdo relativo de água apresentaram recuperação em relação aos controles (Figuras 15A, 15B, 15D e 16), o que também evidencia a elevada capacidade de tolerância das plantas de *Pitcairnia albiflos* ao estresse hídrico.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que:

- Durante o cultivo *in vitro*, plantas mantidas em meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e tampas vedadas tornaram-se hiperídricas. Tal fato foi evidenciado pelo menor acúmulo de pigmentos, principalmente nas plantas cultivadas em meios contendo GA₃, pelo menor acúmulo de prolina e pelos aumentos nas atividades enzimáticas (POD, PPO e CAT) em materiais provenientes de tubos com tampas vedadas. Em função disso, esses materiais apresentariam menores chances de sobrevivência se transferidos diretamente da condição de cultivo *in vitro* para o campo.

- *Ex vitro*, plantas cultivadas *in vitro* em meio de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, em geral, apresentaram atividade enzimática mais baixa ou sem diferenças significativas além de maiores conteúdos de prolina em comparação com as que foram cultivadas na menor concentração de sacarose, independente do regulador de crescimento utilizado. Em função disso, os materiais provenientes de meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose apresentaram melhor aclimatização quando comparados aos cultivados com a menor concentração de sacarose.

- Plantas provenientes de meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose foram mais tolerantes à desidratação, uma vez que elas apresentaram menor redução na atividade das enzimas antioxidantes e maior acúmulo de prolina e pigmentos em resposta ao prolongamento do estresse hídrico. Além desses indicadores, o maior aumento no acúmulo de carboidratos solúveis totais e a menor redução no acúmulo de amido indicam mecanismos mais eficientes de tolerância ao déficit hídrico. A maior capacidade de recuperação em todos os parâmetros avaliados após a reidratação observada nas plantas cultivadas *in vitro* com 30 g L⁻¹ de sacarose reforça essa possibilidade.

- Conclui-se, portanto, que em condições naturais, a sobrevivência das plantas durante a aclimatização e sob estresse hídrico depende das condições de cultivo *in vitro*, especialmente da concentração de sacarose utilizada, e que no presente trabalho, em particular, as plantas de *P. albiflos* cultivadas anteriormente na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose apresentariam maior possibilidade de sobrevivência em condições de campo.

6. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; SHAHEEN, R. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p.149-161, 2007.
- AL-KHAYRI, J.M.; AL-BAHRANI, A.M. Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose-induced osmotic stress in rice. **Biologia Plantarum**, v. 45, n. 4, p. 609-611, 2002.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, 1995.
- ANDRADE, F.S.A.; DEMATTÊ, M.E.S.P. Estudo sobre produção e comercialização de bromélias nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 5, p. 97-110, 1999.
- ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, S. *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 237-244, 2010.
- ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L.A.; NEVES, L.J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 11, p. 1081-1089, 2002.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 235-241, 1992.
- ASADA, K.; TAKAHASHI, M-A.; NAGATE, M. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 38, p. 471-473, 1974.
- BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S.; SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 725-733, 2004.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.D.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.
- BAŤKOVÁ, P.; POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 413-422, 2008.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 106, p. 515-518, 1981.

CAMPOS, A.D.; SILVEIRA, E.M. da L. Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas. **Comunicado Técnico 87** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa Clima Temperado, 1ª edição, Pelotas-RS, 2003.

CAMPOS, M.K.F. de. **Relações hídricas, trocas gasosas e atividade de enzimas antioxidantes em plantas transgênicas de citrumelo “Swingle” com alto acúmulo de prolina submetidas ao déficit hídrico**. Dissertação de M.Sc. UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil. 2009.

CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 79-83, 1999.

CARNEIRO, C.E.A.; ROLIM, H.M.V.; FERNANDES, K.F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 189-193, 2003.

CARVALHO, L.C.; AMÂNCIO, S. Antioxidant defence system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. **Plant Science**, v. 162, p. 33-40, 2002.

CARVALHO, R.I.N.; ZANETTE, F. Conteúdo de carboidratos em gemas e ramos de macieira durante o outono e inverno em região de baixa ocorrência de frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 202-205, 2004.

CAVALCANTE, A. C. R.; CAVALLINI, M.C.; LIMA, N.R.C. de B. Estresse por déficit hídrico em plantas forrageiras. **Documentos On Line 89** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Sobral, CE: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br>. Acesso em: 26/01/2011.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S. Y.; ALI, M. B.; SHIN, K.; PAEK, K. V. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, v. 26, p. 377-388, 2005.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-775, 1955.

CHANEMOUGASOUNDHARAM, A.; SARKAR, D.; PANDEY, S. K.; AL-BISKI, F.; HELALI, O.; MINHAS, J. S. Culture tube closure-type affects potato plantlets growth and chlorophyll contents. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 7-11, 2004.

CHEN, U. C.; HSIA, C. N.; AGRAWAL, D. C.; TSAY, H. S. Influence of ventilation closures on plant growth parameters, acclimation and anatomy of leaf surface in *Scropularia yoshimurae* Yamazaki – a medicinal plant native to Taiwan. **Botanical Studies**, v. 47, p. 259-266, 2006a.

CHEN, U. C.; HSIA, C. N.; YEH, M. S.; AGRAWAL D. C.; TSAY, H. S. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi* – An endangered

medicinal plant native to Taiwan. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 128-133, 2006b.

COFFANI-NUNES, J.V.; FORZZA, R.C. **Bromélias**. Anais do I Seminário Nacional de Recursos Florestais da Mata Atlântica: A exploração e utilização dos recursos, seus impactos sócio-econômicos atuais e potencialidade de manejo sustentável. Reserva da Biosfera; Fundação SOS Mata Atlântica; Jardim Botânico do Rio de Janeiro e EMBRAPA-CENARGEN. p. 40-44, 2001.

DAL VESCO, L.L.; STEFENON, V.M.; WELTER, L.J.; SCHERER, R.F.; GUERRA, M.P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 515-522, 2011.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

DEWIR, Y.H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 93-99, 2006.

DROSTE, A.; SILVA, A.M.da; MATOS, A.V.; ALMEIDA, J.W.de. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ENDRES, L.; MERCIER, H. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habitats cultivate *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemical**, v. 41, p. 181-187, 2003.

ENDRES, L.; SOUZA, B. M.; MERCIER, H. *In vitro* nitrogen nutrition and hormonal pattern in bromeliads. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 481-486, 2002.

ERTURK, U.; SIVRITEPE, N.; YERLIKAYA, C.; BOR, M.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 3, p. 597-600, 2007.

FENG, Z.; GUO, A.; FENG, Z. Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 277-283, 2003.

FORZZA, R.C. *Encholirium*: um gênero ameaçado. **Bromélia**, v. 5, n. 1-4, p. 15-18, 1998.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 696-717, 1994.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARÍA, J. M. High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 7-15, 2005.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS 2005. (Lista de espécies ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais). <http://www.biodiversitas.org.br/cepf/edital/flora_iucn.pdf.>

GARG, B.K.; KATHJU, S.; BURMAN, U. influence of water stress on metabolism relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 2, p. 289-292, 2001.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GIRARDI, C.G.; PESCADOR, R. Acimação de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 12, n. 1, p. 62-72, 2010.

GOMES, F. P. **Curso de Estatística Experimental**. 10.ed. São Paulo: Nobel, p. 430, 1982.

GOUR, V. S.; SHARMA, S. K.; EMMANUEL, C. J. S. K.; KANT, T. Stomata and chlorophyll content as marker traits for hardening of *in vitro* raised *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. Plantlets. **National Academy Science Letters-India**, v. 30, p. 45-47, 2007.

GRANT, J. R.; ZIJLSTRA, G. An annotated catalogue of the generic names of the Bromeliaceae. **Selbyana**, v. 19, n. 1, p. 91-121, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., (Eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 1, p.233-237, 1998.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: Jain, S.M., Ochatt, S.J. (Eds.), **Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants: Methods in Molecular Biology**, vol 589. Humana Press, New York, p. 47–66, 2010.

GUPTA, S. D.; PRASAD, V.S.S. Shoot multiplication kinetics and hyperhydric status of regenerated shoots of gladiolus in agar-solidified and matrix-supported liquid cultures. **Plant Biotechnol Reports**, v. 4, p. 85-94, 2010.

HARTMAN, H.T.; KESTER, D.F.; DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. 2002. **Plant propagation: principles and practices**. 7^a ed., p. 880.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

- HUANG, P.-L.; LIAO, L.-J.; TSAI, C.-C.; LIU, Z.-H. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 73-78, 2011.
- IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, v. 60, p. 143-150, 2010.
- JACQUES-FÉLIX, H. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. **Selbyana**, v. 21, n. 2, p.118-124, 2000.
- JEON, M. W.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during *ex vitro* acclimatization of micropropagated CAM *Doritaenopsis* plantlets under relative humidity and air temperature. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, p. 183-194, 2006.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.
- KAUL, K.; SABHARWAL, P. S. Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 47, p. 691-695, 1971.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.
- KOCHEVA, K.V.; BUSHEVA, M.C.; GEORGIEV, G.I.; LAMBREV, P.H.; GOLTSEV, V.N. Influence of short-term osmotic stress on the photosynthetic activity of barley seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 1, p. 145-148, 2005.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation – Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, n. 4, p. 188-204, 2010.
- KRISHNA, H.; SAIRAM, R.K.; SINGH, S.K.; PATEL, V.B.; SHARMA, R.R.; GROVER, M.; NAIN, L.; SACHDEV, A. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. **Scientia Horticulturae**, v. 118, p. 132-138, 2008.
- KUMMEROVÁ, M.; ZEZEKA, Š.; KRÁL'OVÁ, K.; MASAROVÍČOVÁ, E. Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 308-314, 2010.
- LEME, E. M. C. **Bromélias da Mata Atlântica: Canistrum**. Salamandra, Rio de Janeiro, p.107, 1997.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LIMA, M. da G. de S.; LOPES, N.F.; BACARIN, M.A.; MENDES, C.R. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, v. 63, n. 3, p. 335-340, 2004.

LOBO, G.M. **Morfoanatomia da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae).**

Dissertação de M. Sc. UFSC. Florianópolis. SC. Brasil. 2007.

LOWRY, O H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A L.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomies.** The Bromeliad Society Inc. Oregon. 2000.

MAIA, P.S.P.; OLIVEIRA NETO, C.F. de; CASTRO, D. da S.; FREITAS, J.M.N. de; LOBATO, A.K. da S.; COSTA, R.C.L. da. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 918-920, 2007.

MANTOVANI, A. A method to improve leaf succulence quantification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 1, p. 9-14, 1999.

MAPES, O. M. Tissue culture of bromeliads. **International Plant Propagators Society Combined Proceedings**, v. 23. p. 47-55, 1973.

MEDINA, E. Eco-fisiologia y evolution de las Bromeliaceae. **Boletim de La Academia Nacional de Ciencias**, v. 59, p. 71-100, 1990.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 453-467, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-409, 2002.

MOHAMMADKHANI, N; HEIDARI, R. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, p. 448-453, 2008.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F. de; CARVALHO, J. F. R. P. de; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. 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.

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

PANDA, S.K.; CHOUDHURY, S. Chromium stress in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 95-102, 2005.

PARIDA, A.K.; DAGAONKAR, V.S.; PHALAK, M.S.; UMALKAR, G.V.; AURANGABDKAR, L.P. Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. **Plant Biotechnology**, v. 1, p. 37-48, 2007.

- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANTANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 137-143, 1999.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous african bromeliad. **Harvard Papers Botany**, v. 4, n. 1, p. 175-184, 1999.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.
- ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A.de; FELISBINO, C.; CRESTANI, R.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L.da. Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. micropropagados. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, n. 2, p. 279-281, 2003.
- SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.120, p. 152-161, 2004.
- SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 149-158, 2005.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.
- SIEGEL, B.Z. Plant peroxidase - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, v. 12, p. 303-312, 1993.
- SILVA, E.C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; VALE, F.H.A.; MELO, N.F. de ; ARAÚJO, F.P. de. Water relations and organic solutes production in four umbu tree (*Spondias tuberosa*) genotypes under intermittent drought. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 21, n. 1, p. 43-53, 2009.
- ŚLESIAK, I.; HALDAS, W.; SLESIAK, H. Influence of exogenous carbohydrates on superoxide dismutase activity in *Trifolium repens* L. explants cultured *in vitro*. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 48, p. 93-98, 2006.
- SMITH, J.A.C. Epiphytic Bromeliads. In: Ulrich Luttge (Ed). **Vascular Plants as Epiphytes-Evolution and Ecophysiology**. Berlin:Springer-Verlag, p.108-138, 1989.
- SONEJI, J.R.; RAO, P.S.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 10, p. 891-894, 2002.
- SREEDHAR, R.V.; VENKATACHALAM, L.; NEELWARNE, B. Hyperhydricity-related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). **Journal Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 46-57, 2009.
- VALENTE, A.S.M.; ASSIS, L.C.S.; FORZZA, R.C. **Extrativismo, produção e comercialização de espécies de bromélias em cinco regiões do estado de Minas Gerais**. In: LII Congresso Nacional de Botânica, p.71-71, João Pessoa, 2001.

VAN DEN ENDE, W.; VALLURU, R. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 9-18, 2009.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, p. 280-283, 1968.

VAN HUYLENBROECK, J.M.; DEBERGH, P.C. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosyntheses and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. **Physiologia Plantarum**, v. 96, p. 298-304, 1996.

WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 108, p. 386-389, 1983.

WENDT, T.; CHAMAS, C.C. As Pitcairnia do leste do Brasil – suas verdadeiras identidades. **Bromelia**, v. 4, p. 12-18, 1997.

WU, Z.; CHEN, L.J.; LONG, Y.J. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 45, p. 483-490, 2009.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 149-158, 2011.

XU, J.; YIN, H.; LI, X. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 325-333, 2009.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 450-458, 2004.

ZORNIG, R.K. Micropropagação de Bromélias. **Bromélia**, v. 3, p. 3-8, 1996.