

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Aline Mystica Silva de Oliveira

**CULTIVO *IN VITRO* E PERFIS DE ISOENZIMAS ANTIOXIDATIVAS EM  
ESPÉCIES DE BROMÉLIAS**

Juiz de Fora, MG

2016

**Aline Mystica Silva de Oliveira**

**CULTIVO *IN VITRO* E PERFIS DE ISOENZIMAS ANTIOXIDATIVAS EM  
ESPÉCIES DE BROMÉLIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Orientador: Paulo Henrique Pereira Peixoto

Juiz de Fora, MG

Abril, 2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Aline Mystica Silva de.

Cultivo in vitro e perfis de isoenzimas antioxidativas em espécies de bromélias / Aline Mystica Silva de Oliveira. -- 2016.

118 f. : il.

Orientador: Paulo Henrique Pereira Peixoto

Coorientadores: Priscila de Faria Pinto, Cleberson Ribeiro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ecologia, 2016.

1. Atividade enzimática. 2. Biodiversidade. 3. Eletroforese. 4. Propagação in vitro. 5. Regiões foliares. I. Peixoto, Paulo Henrique Pereira, orient. II. Pinto, Priscila de Faria, coorient. III. Ribeiro, Cleberson, coorient. IV. Título.

**Aline Mystica Silva de Oliveira**

**CULTIVO *IN VITRO*, E PERFIS DE ISOENZIMAS ANTIOXIDATIVAS EM  
ESPÉCIES DE BROMÉLIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

**Aprovado em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF (Orientador)**

---

**Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF**

---

**Prof. Dr. Cleberson Ribeiro**  
**Universidade Federal de Viçosa– UFV**

*À Deus, minha Luz*

*E à minha família*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

A Nossa Senhora e a Deus, por sempre iluminarem o meu caminho e guiarem os meus passos a cada dia!

À minha família, por sempre me apoiar em meus sonhos. A minha mãe Glória, pelo infinito Amor e por ter me ensinado sempre a batalhar pelos meus sonhos, mesmo quando parecia muito difícil alcançá-los, você é minha inspiração! Ao meu pai, João pelos valores que me ensinou a cultivar desde pequena e que eu levarei para a vida inteira. Ao meu irmão, Leandro por seu meu grande amigo e incentivador, por sempre me fazer acreditar, acreditando até mais que eu, obrigada pelo tempo que moramos juntos e por ser o Meu Irmão! Ao meu namorado Humberto, por sempre estar ao meu lado, pelo companheirismo e compreensão quando o tempo era corrido demais e pelas infinitas alegrias vividas! A minha cunhada, Aline por também sempre me incentivar, muito obrigada pelo carinho especialmente durante o tempo que moramos junto! A dona Aparecida e Sr. Jorge pelo carinho de sempre e por ter me acolhido tão bem em sua casa.

Ao meu orientador Paulo Henrique Pereira Peixoto, pela confiança desde o início deste trabalho, pelos ensinamentos, por ser um excelente professor e por ter me recebido tão bem no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFJF, que se tornou a minha segunda casa. A professora Priscila de Faria Pinto pela disponibilidade de sempre, pelo imensurável apoio para a realização deste trabalho, por disponibilizar o Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas- UFJF e por ser uma pessoa maravilhosa que me permitiu descobrir o mundo da eletroforese. Ao professor Cleberon Ribeiro por toda a sua colaboração por ter disponibilizado o Laboratório de Laboratório de Genética Molecular de Plantas- UFV, por ter elucidado tantas dúvidas nas análises. Ao professor Acelino Alfenas por ter me acolhido no Laboratório de Fitopatologia Vegetal- UFV, por ter disponibilizado o laboratório e também ao técnico de laboratório Renildo, ao qual sou imensamente grata, pelo auxílio nas eletroforeses.

Aos meus amigos que conheci no Laboratório de Fisiologia Vegetal e que levarei para a vida inteira: Cristiano, pelos ensinamentos, pela convivência sempre muito agradável e pela parceria nas análises que pareciam muitas vezes intermináveis, ao Vinicius meu amigo desde a graduação que tive o privilégio de reencontrar no mestrado obrigada por toda ajuda e parceria, e à todos os alunos de Iniciação Científica que me ajudaram nesse período principalmente a Raquel, Felipe, Camila e Tiago.

À minha amiga Andreza, pela convivência muito agradável por dividir as angústias e as felicidades, à Paulinha que se tornou uma grande amiga por sempre partilhar as dúvidas e as certezas e por ter me acolhido tão bem em sua casa que se tornou a nossa casa, à Chris e à Cirlei

pela amizade e risadas, à Nayara e à Michéla pela disponibilidade de sempre em me ajudar com os géis e por terem se tornado antes de tudo minhas amigas. Obrigada meninas!!!

Por fim, obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho!

À CAPES pelo financiamento da bolsa. Ao PGECOL e UFJF, pela infraestrutura e auxílio financeiro.

*“Tudo é uma questão de manter  
A mente quieta  
A espinha ereta  
E o coração tranquilo”*

Leila Pinheiro



**RESUMO** - A família Bromeliaceae apresenta distribuição essencialmente neotropical, contando com 52 gêneros que abrangem 3.320 espécies. Das espécies de bromélias, 34% são exclusivas da Mata Atlântica, sendo que *Portea petropolitana* e *Billbergia horrida* se enquadram nessa categoria. O acelerado processo de destruição dos ecossistemas, somado ao extrativismo predatório, tem levado a reduções drásticas nas populações. Apesar de sua importância ecológica, medicinal e ornamental, a realização de pesquisas fisiológicas com bromélias ainda é rara. A cultura de tecidos apresenta-se como uma alternativa bastante atrativa para a conservação de espécies ameaçadas, possibilitando a obtenção de taxas elevadas de multiplicação a partir de diferentes explantes. Visando promover a conservação *in vitro* de plantas de *Billbergia horrida*, *Portea petropolitana* e *Tillandsia polystachia* assim como a multiplicação em larga escala, este estudo teve por objetivos o estabelecimento de protocolos eficientes de multiplicação utilizando diferentes reguladores de crescimento (BAP, CIN, TDZ e GA<sub>3</sub>) buscando identificar as concentrações ideais dos mesmos para o cultivo de cada uma das espécies. O tratamento que promoveu as maiores taxas de multiplicação *in vitro* de *P. petropolitana* foi o suplementado com BAP a 7,5 µM. As maiores taxas de enraizamento foram observadas no tratamento suplementado com 5 µM de GA<sub>3</sub>. Para *B. horrida* o tratamento que promoveu as maiores taxas de propagação *in vitro* foi o suplementado com BAP a 2,5 µM. Plântulas com maior número de raízes foram obtidas em resposta à suplementação do meio de cultura com GA<sub>3</sub> a 2,5 µM. O tratamento que promoveu a melhor taxa de propagação *in vitro* de *T. polystachia* foi o suplementado com BAP a 2,5 µM. Um maior número de raízes foi obtido em resposta ao GA<sub>3</sub> a 10 µM. Plântulas das três espécies foram eficientemente aclimatizadas *ex vitro*. Devido à presença do O<sub>2</sub> na atmosfera terrestre, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um processo inevitável em eventos metabólicos essenciais como a fotossíntese e a respiração. Os sistemas de defesa que promovem a eliminação das EROs envolvem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Embora alguns estudos tenham investigado a separação funcional existente ao longo das folhas de bromélias epífitas com tanque, alguns deles inclusive envolvendo enzimas essenciais ao metabolismo vegetal, pesquisas relacionando os sistemas enzimáticos e isoenzimáticos antioxidativos nas diferentes regiões das folhas de bromélias inexistem até o momento. No presente estudo, em plantas mantidas em condições de campo, foram avaliadas as atividades enzimáticas brutas e os perfis isoenzimáticos das enzimas catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em diferentes regiões das folhas (apical, mediana e basal) de *Portea Petropolitana* e *Billbergia horrida*, assim como em diferentes estratos de altura de um forófito (inferior, mediano e superior) em *Tillandsia polystachia*. Padrões específicos de expressão das isoenzimas SOD e POD foram observados nas diferentes porções das folhas de *P. petropolitana*. A atividade da CAT não foi detectada em nenhuma das porções das folhas das três espécies. O maior número de isoformas da SOD e a maior intensidade da isoforma da POD,

observados na região apical das folhas de *P. petropolitana*, estão, aparentemente, relacionados à atividade metabólica mais intensa resultante da maior atividade fotossintética e do nível de maturidade dessa porção da folha. Esses resultados foram corroborados pelas maiores atividades dessas enzimas também observadas na porção apical das folhas por meio de métodos espectrofotométricos. A região apical da folha é o principal sítio de assimilação fotossintética e de biossíntese de parede celular e lignina nas bromélias, envolvendo processos metabólicos normalmente relacionados à geração de EROs. Nos estudos de eletroforese realizados com *B. horrida* um mesmo padrão de isoformas da SOD foi observado em todas as regiões foliares avaliadas. Todavia, para a POD, diferentes padrões de intensidade na expressão isoenzimática foram detectados nas diferentes partes da folha. A maior intensidade das isoformas da POD observada na região apical das folhas também parece estar relacionada à maior maturidade fisiológica dessa região, resultado corroborado pela atividade enzimática mais intensa observada para essa enzima na análise espectrofotométrica realizada com materiais provenientes da região apical da folha. Durante a senescência foliar, as PODs, juntamente com outras enzimas, estão envolvidas na biossíntese de parede celular e de lignina, através de mecanismos que envolvem a produção e o acúmulo de EROs. Em *T. polystachia*, um mesmo padrão de isoenzimas da SOD foi observado nos diferentes estratos do forófito. Nessa espécie, a atividade da POD não foi observada nas análises de eletroforese, embora tenha sido detectada por espectrofotometria, especialmente nas posições medianas e mais elevadas do forófito. Na análise espectrofotométrica, as atividades das CATs e das SODs mostraram padrões de expressão similares, com valores mais elevados encontrados nas posições mais baixas e mais elevadas do forófito. Esses resultados revelaram a ocorrência de variação na atividade enzimática em plantas de *T. polystachia* em resposta à posição (altura) no forófito. O teor de proteínas também seguiu o mesmo padrão em resposta ao estrato de localização das plantas no forófito. Os resultados encontrados no presente estudo permitem concluir que, para as três espécies estudadas, o BAP foi o regulador de crescimento que promoveu as maiores taxas de multiplicação *in vitro*, sendo o GA<sub>3</sub> o regulador de crescimento que possibilitou a obtenção de plântulas enraizadas e prontas para a fase de aclimatização. As três espécies de bromélias estudadas foram eficientemente aclimatizadas após três meses de cultivo *in vitro*. O perfil de expressão das isoenzimas da SOD e da POD variou conforme as regiões das folhas em *P. petropolitana*. Em *B. horrida*, a SOD exibiu o mesmo padrão de isoformas em todas as regiões foliares, embora diferentes padrões de intensidade na expressão isoenzimática da POD tenham sido detectados. Em *T. polystachia*, a SOD exibiu o mesmo perfil de isoenzimas nos diferentes estratos do forófito. Esses resultados são os primeiros relatos sobre a variação espacial da atividade enzimática antioxidativa e da expressão isoenzimática em folhas de espécies de bromélias.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática, biodiversidade, eletroforese, propagação *in vitro*, regiões foliares.

**ABSTRACT** - Bromeliaceae has essentially neotropical distribution, with 52 genera covering 3,320 species. The bromeliad species, 34% are unique to the Atlantic Forest, *Portea petropolitana* and *Billbergia horrida* fall into this category. The accelerated process of destruction of ecosystems, coupled with the predatory extraction has led to drastic reductions in populations. Although its ecological importance, medicinal and ornamental, conducting physiological studies with bromeliads is still rare. Tissue culture is presented as a very attractive alternative for the conservation of endangered species, allowing obenção of high multiplication rates from different explants. To promote *in vitro* conservation *Billbergia horrida*, *Portea petropolitana* and *Tillandsia polystachia* plants as multiplication on a large scale, this study aimed to establish efficient multiplication protocols using different growth regulators (BAP, KIN, TDZ and GA<sub>3</sub>) seeking to identify the optimal concentrations there of for the cultivation of individual species. The treatment produced the greatest *in vitro* multiplication rates of *P. petropolitana* was supplemented with BAP at 7.5 uM. The highest rooting rates were observed in the treatment supplemented with 5 uM of GA<sub>3</sub>. To *B. horrida* treatment which produced the greatest of *in vitro* propagation rates was supplemented with 2.5 uM BAP. Seedlings with larger roots were obtained in response to the supplementation of culture medium with GA<sub>3</sub> at 2.5 uM. The treatment promoted the best *in vitro* propagation rate *T. polystachia* was supplemented with 2.5 uM BAP. A higher number of roots was obtained in response to GA<sub>3</sub> 10 uM. Seedlings of the three species were efficiently acclimatized *ex vitro*. Due to the presence of O<sub>2</sub> in the atmosphere, the formation of reactive oxygen species (ROS) is an inevitable process in essential metabolic events such as photosynthesis and respiration. Defense systems that promote the elimination of ROS involving enzymatic and non-enzymatic mechanisms. Although some studies have investigated the existing functional compartmentalization along the leaves of epiphytic bromeliad tank, including some involving enzymes essential to plant metabolism, research relating the enzyme systems and antioxidative isozyme in different regions of the bromeliad leaves do not exist yet. In this study, in plants grown under field conditions, gross enzymatic activities and enzyme profiles of catalase enzymes were evaluated (CAT), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) in different regions of the leaves (apical, median and basal) of *Portea petropolitana* and *Billbergia horrida*, and in different strata of height of a host tree (lower, middle and higher) in *Tillandsia polystachia* specific patterns of expression of SOD isoenzymes and POD were observed in different portions of the sheets *P. petropolitana*. The CAT activity was not detected in any of the portions of the sheets of the three species. The largest number of isoforms of SOD and the greater intensity of isoform of POD, observed in the apical

region of *P. petropolitana* leaves are apparently related to more intense metabolic activity resulting from higher photosynthetic activity and the level of maturity of this portion of the leaf. These results were supported by higher activity of these enzymes also observed in the apical portion of the leaves through spectrophotometric methods. The apical region of the leaf is the primary photosynthetic assimilation site and cell wall biosynthesis and lignin in bromeliads, involving metabolic processes typically related to the generation of ROS. In electrophoresis studies with *B. horrida* the same pattern of SOD isoforms was observed in all evaluated foliar regions. However, for the POD different intensity patterns in the isozyme expression were detected in different parts of the sheet. The greatest intensity of POD isoforms observed in the apical region of the leaves also seems to be related to increased physiological maturity of the region, a result confirmed by more intense enzymatic activity observed for this enzyme in the spectrophotometric analysis with materials from the apical region of the sheet. During senescence, the pods along with other enzymes, are involved in cell wall biosynthesis and lignin, through mechanisms that involve the production and accumulation of ROS. In *T. polystachia*, the same pattern of SOD isoenzymes was observed in different strata of the host tree. In this species, the POD activity was not observed in the electrophoresis analysis, although it has been detected by spectrophotometry, especially in middle positions and higher phorophyte. In the spectrophotometric analysis, the activities of CAT and SODs showed similar patterns of expression, with highest values observed in lower positions and higher phorophyte. These results revealed the occurrence of variation in the enzymatic activity in *T. polystachia* plants in response to the position (height) in phorophyte. The protein content also followed the same pattern in response to the stratum location of the plants in phorophyte. The results of this study allow us to conclude that, for the three species studied, the BAP was the growth regulator which promoted the highest *in vitro* multiplication rates, and the GA<sub>3</sub> growth regulator which enabled obtaining rooted and ready seedlings for the acclimatization phase. The three species of bromeliads studied were efficiently acclimatized after three months of *in vitro* culture. The expression profile of the isoenzymes of SOD and POD varied as the regions of the leaves of *P. petropolitana*. In *B. horrida*, SOD exhibited the same pattern of isoforms in all foliar regions, although different intensity patterns in the isozyme expression of POD were detected. In *T. polystachia*, SOD showed the same profile of isozymes in different strata of the host tree. These results are the first reports of the spatial variation of antioxidative enzyme activity and isoenzyme expression in leaves of bromeliads species.

**Keywords:** biodiversity, electrophoresis, enzymatic activity, *in vitro* propagation, leaf regions.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Detalhes de plântulas de *P. petropolitana* cultivados *in vitro* em meio MS suplementado com CIN (1, 2, 3, 4 - **A**), TDZ (5, 6, 7, 8, 9 - **A**), BAP (9, 10, 11, 12 - **B**) e GA<sub>3</sub> (13, 14, 15, 16 - **B**), 90 dias após a inoculação. Todos os reguladores de crescimento estão, respectivamente, a 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 µM. Plântulas aclimatizadas de *P. Petropolitana* (**C**), 35 dias após a transferência para condições *ex vitro*.....53

**Figura 2.** Géis de poli(acrilamida) nativos das isoenzimas da SOD e da POD de extratos de folhas de *Portea petropolitana* de três indivíduos estabelecidos em condições naturais. **Gel A:** Indivíduo 1: poços 1 e 2 (porção apical) poços 3 e 4 (porção mediana); poços 5 e 6 (porção basal). Indivíduo 2: poços 7 e 8 (porção apical); poços 9 e 10 (porção mediana). **Gel B:** Indivíduo 2: poços 1 e 2 (região basal). Indivíduo 3: poços 3 e 4 (porção apical); poços 5 e 6 (porção mediana); poços 7 e 8 (porção basal); Indivíduos 1 e 3: poços 9 e 10, respectivamente (porção apical). **Gel C:** Indivíduo 1: poços 1 e 2 (porção apical) poços 3 e 4 (porção mediana); poços 5 e 6 (porção basal). Indivíduo 2: poços 7 e 8 (porção apical); poços 9 e 10 (porção mediana). **Gel D:** Indivíduo 2: poços 1 e 2 (região basal). Indivíduo 3: poços 3 e 4 (porção apical); poços 5 e 6 (porção mediana); poços 7 e 8 (porção basal); Indivíduos 1 e 3: poços 9 e 10, respectivamente (porção apical). **Gel E:** Indivíduo 1 -*Portea petropolitana*: poços 1, 2 e 3 (região apical); Indivíduo 1 -*Tillandsia polystachia*: poços 4, 5 e 6 (região apical); Indivíduo 1-*Billbergia horrida*: poços 7, 8 e 9 (porção apical).....60

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Detalhes de plântulas de *B. horrida* cultivadas *in vitro* em meios MS suplementados com KIN (1, 2, 3, 4 - **A**), de TDZ (5, 6, 7, 8, 9 - **A**), BAP (9, 10, 11, 12 - **B**) e GA<sub>3</sub> (13, 14, 15, 16 - **B**), 90 dias após a inoculação. Todos os reguladores de crescimento estão, respectivamente, a 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 µM. Plântulas aclimatizadas *B. horrida* (**C**), 35 dias após a transferência para condições *ex vitro*.....80

**Figura 2.** Géis de poli(acrilamida) nativos das isoenzimas da POD e da SOD de extratos de folhas de *Billbergia horrida* de três indivíduos estabelecidos em condições naturais. **Gel A:** Indivíduo 1: poços 1 e 2 (porção apical) poços 3 e 4 (porção mediana); poços 5 e 6 (porção basal). Indivíduo 2: poços 7 e 8 (porção apical); poços 9 e 10 (porção mediana). **Gel B:** Indivíduo 2: poços 1 e 2 (região basal). Indivíduo 3: poços 3 e 4 (porção apical); poços 5 e 6 (porção mediana); poços 7 e 8 (porção basal); Indivíduos 1 e 3: poços 9 e 10, respectivamente (porção apical). **Gel C:** Indivíduo 1-*Portea petropolitana*: poços 1, 2 e 3 (região apical); Indivíduo 1-*Tillandsia polystachia*: poços 4, 5 e 6

(região apical); Indivíduo 1- *Billbergia horrida*: poços 7, 8 e 9 (porção apical). **Gel D:** Indivíduo 1: poços 1 e 2 (porção apical) poços 3 e 4 (porção mediana); poços 5 e 6 (porção basal). Indivíduo 2: poços 7 e 8 (porção apical); poços 9 e 10 (porção mediana). **Gel B:** Indivíduo 2: poços 1 e 2 (região basal). Indivíduo 3: poços 3 e 4 (porção apical); poços 5 e 6 (porção mediana); poços 7 e 8 (porção basal); Indivíduos 1 e 3: poços 9 e 10, (porção apical).....87

**Figura 3:** Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos de folhas de *Billbergia horrida* de três indivíduos estabelecidos em condições naturais. O poço 1 corresponde ao marcador de peso molecular. Poços 2, 3 e 4 correspondem à região apical, mediana e basal de folhas do indivíduo 1. Poços 5, 6 e 7 correspondem à região apical, mediana e basal de folhas do indivíduo 2. Poços 8, 9 e 10 (região apical, mediana e basa do indivíduo 3).....91

### CAPÍTULO 3

**Figura 1.** Detalhes de plântulas de *T. polystachia* cultivadas *in vitro* em meios MS suplementados com KIN (1, 2, 3, 4 - **A**), de TDZ (5, 6, 7, 8, 9 - **A**), BAP (9, 10, 11, 12 - **B**) e GA<sub>3</sub> (13, 14, 15, 16 - **B**), 90 dias após a inoculação. Todos os reguladores de crescimento foram adicionados, respectivamente, a 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 Mm.....106

**Figura 2.** Géis de poliacrilamida nativos das isoenzimas da SOD e da POD de extratos de folhas de *Tillandsia polystachia* de três indivíduos estabelecidos em condições naturais em diferentes alturas de um forófito. **Gel A:** Indivíduo 1: poços 1, 2 e 3 (altura 1); poços 4, 5 e 6 (altura 2); poços 7, 8 e 9 (altura 3). **Gel B:** Indivíduo 1-*Portea petropolitana*: poços 1, 2 e 3 (região apical); Indivíduo 1-*Tillandsia polystachia*: poços 4, 5 e 6 (região apical); Indivíduo 1-*Billbergia horrida*: poços 7, 8 e 9 (porção apical).....111

**Figura 3:** Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos de folhas de *Tillandsia polystachia* de três indivíduos estabelecidos em condições naturais em diferentes alturas de um forófito. O poço 1 corresponde ao marcador de peso molecular. Os poços 2, 3 e 4 (altura 1). Os poços 5, 6 e 7 (altura 2). Os poços 8, 9 e 10 (altura 3).....112

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Número total de brotações em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após inoculação.....52

**Tabela 2.** Número total de brotações maiores que 2 cm em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após inoculação.....54

**Tabela 3.** Número total de raízes em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....55

**Tabela 4.** Tamanho de raízes em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....56

**Tabela 5.** Média das notas em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....56

**Tabela 6.** Atividade de POD [ $\text{nmol mg}^{-1} (\text{prot.}) \text{min}^{-1}$ ], SOD [ $\text{U mg}^{-1} (\text{prot.})$ ] e de proteínas totais [ $\text{mg g}^{-1} (\text{f.m.})$ ] provenientes de três regiões foliares diferentes em *Portea petropolitana* .....57

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Número total brotações em explantes de *Billbergia horrida* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....79

**Tabela 2.** Número total de brotações maiores que 2 cm em explantes de *Billbergia horrida* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....81

**Tabela 3.** Número total de raízes em explantes de *Billbergia horrida* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....82

**Tabela 4.** Tamanho de raízes em explantes de *Billbergia horrida* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....82

**Tabela 5.** Média das notas atribuídas a explantes de *Billbergia horrida* obtidos *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após inoculação.....83

**Tabela 6.** Atividade de POD [nmol mg<sup>-1</sup> (prot.) min<sup>-1</sup>], SOD [U mg<sup>-1</sup> (prot.)] e de proteínas totais [mg g<sup>-1</sup> (f.m.)] provenientes de três regiões foliares diferentes em *Billbergia horrida*.....84

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Número total brotações em explantes de *Tillandsia polystachia* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....105

**Tabela 2.** Número de raízes em explantes de *Tillandsia polystachia* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....107

**Tabela 3.** Tamanho de raiz em explantes de *Tillandsia polystachia* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....107

**Tabela 4.** Média das notas atribuídas a explantes de *Tillandsia polystachia* obtidos *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.....108

**Tabela 5.** Conteúdo de CAT [mmol mg<sup>-1</sup> (prot.) min<sup>-1</sup>], POD [nmol mg<sup>-1</sup> (prot.) min<sup>-1</sup>], SOD [Umg<sup>-1</sup> (prot.)] e de proteínas totais [mg g<sup>-1</sup> (f.m.)] em tecidos foliares de *Tillandsia polystachia*, provenientes de três estratos do forófito.....109



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	17
<b>2.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29
<b>3.</b>	<b>CAPÍTULO 1 - “Propagação <i>in vitro</i> e análises enzimáticas em plantas de <i>Portea petropolitana</i> (Wawra) Mez”</b> .....	46
	INTRODUÇÃO.....	47
	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS .....	64
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 2 - “Propagação <i>in vitro</i> e análises enzimáticas em plantas de <i>Billbergia horrida</i> Regel”</b> .....	72
	INTRODUÇÃO.....	73
	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	92
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO 3 – “Propagação <i>in vitro</i> e análises enzimáticas em plantas de <i>Tillandsia polystachia</i> (L.)”</b> .....	99
	INTRODUÇÃO .....	100
	MATERIAL E MÉTODOS.....	101
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
	REFERÊNCIAS .....	113

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Bromeliaceae é composta por 52 gêneros que abrangem 3.320 espécies (The PlantList, 2013) nativas das Américas, com exceção apenas de *Pitcairnia feliciana*, nativa da África. A família é predominantemente neotropical (Benzing, 2000), e subdividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Smith & Downs, 1974; Cronquist, 1988). Atualmente, com base em estudos filogenéticos realizados por Givnish *et al.* (2011), propõe-se uma nova classificação dos gêneros nas subfamílias: Brocchinioideae, Bromeliaceae, Hechtia, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnia, Puyoideae e Tillandsioideae. O Brasil se destaca por englobar aproximadamente 73% dos gêneros e 38% das espécies de bromélias (Forzza *et al.*, 2010). A família possui dois grandes centros de diversidade genética: a costa leste do Brasil, nos domínios da Floresta Atlântica, o Escudo das Guianas e os Andes (Smith & Downs, 1974; Martinelli *et al.*, 2008).

A família Bromeliaceae apresenta elevada riqueza, diversidade e endemismo nos domínios da Mata Atlântica, possuindo o mais alto número de espécies ameaçadas, fato que a coloca como prioridade em programas de conservação da biodiversidade (Pilatti *et al.*, 2011). Das espécies de bromélias, 34% são exclusivas da Mata Atlântica, sendo que *Portea petropolitana* e *Billbergia horrida*, duas das espécies foco do presente estudo, se encontram nessa categoria (Versieux & Wendt, 2007). Dentre as espécies de Bromeliaceae ocorrentes na Mata Atlântica cerca de 40% encontram-se sob algum grau de ameaça, havendo, inclusive, espécies incluídas em mais de uma categoria. É possível que esse número esteja subestimado em função do déficit de informações relativas ao real estado de conservação das populações em seus ambientes naturais (Martinelli *et al.*, 2008).

A exploração predatória da Floresta Atlântica e o extrativismo para fins comerciais são as principais fontes de abastecimento do mercado, ameaçando muitas populações naturais (Mendes *et al.*, 2007). Segundo Martinelli *et al.* (2008), dez gêneros de bromélias (*Andrea*, *Canistropsis*, *Canistrum*, *Edmundoa*, *Fernseea*, *Lymania*, *Nidularium*, *Portea*, *Quesnelia* e *Wittrockia*) e 653 espécies são endêmicos dos domínios da Mata Atlântica. O Bioma Mata Atlântica é uma das 35 áreas listadas como *hotspots* mundiais para a conservação da vida selvagem (Myers, 2000; Zachos & Habel, 2011). No entanto, restam apenas 11,73% da sua área original (Ribeiro *et al.*, 2009). O grau de ameaça à conservação desse bioma é alarmante, devido aos níveis elevados de diversidade e endemismo em seus domínios (Myers, 2000; Ribeiro *et al.*, 2011).

As plantas epífitas destacam-se como uma das características mais notáveis da Mata Atlântica, com altos níveis de riqueza e diversidade (Kersten, 2010). As bromélias contribuem significativamente para a manutenção da diversidade biológica, sendo o equilíbrio interativo entre

as espécies um dos componentes mais marcantes das florestas tropicais (Benzing, 2000). O extrativismo tem conduzido a uma acentuada redução da abundância e da diversidade de bromélias em diversas regiões, promovendo a perda de inúmeras formas de vida microscópicas e macroscópicas cujos ciclos de vida são dependentes das bromélias, o que tem ocasionado uma redução da diversidade biológica dos ecossistemas como um todo (Rocha *et al.*, 2004).

Em bromélias, a propagação sexual é considerada lenta. Em algumas espécies a maturação das sementes pode ocorrer até um ano após a polinização (Stringueta *et al.*, 2005). Em função disso, a cultura de tecidos apresenta-se como uma alternativa bastante promissora, apresentando vantagens em relação aos métodos convencionais de propagação devido às elevadas taxas de obtenção de mudas a partir de uma única gema, à geração de plantas livres de problemas fitossanitários (Paiva *et al.*, 2006; Carvalho, Rodrigues & Santos, 2012) e às reduções no tempo de obtenção, espaço e nos custos de produção (Grattapaglia & Machado, 1999; Ayoama *et al.*, 2012).

A micropropagação tem sido considerada uma estratégia eficiente para se propagar material genético de espécies raras e ameaçadas com a finalidade de assegurar, em longo prazo, a sobrevivência desse material em seu ambiente natural (Mercier & Nievola, 2003). A tecnologia da cultura de tecidos é eficiente como um meio para a conservação de germoplasma, assegurando a sobrevivência de espécies de plantas e uma rápida propagação em massa visando a re-vegetação em larga escala (Anis *et al.*, 2012) e a produção de materiais propagativos com elevada qualidade genética. Em um levantamento realizado por Carvalho, Rodrigues & Santos (2012) sobre as plantas micropropagadas no Brasil, foi relatado que 38,8% das mudas micropropagadas produzidas correspondiam a flores e plantas ornamentais, com liderança das orquídeas e, logo em seguida, as bromélias, com 30,7%, confirmando ser esta a segunda família mais cultivada comercialmente. Os principais gêneros micropropagados de Bromeliaceae são: *Guzmania*, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Neoregelia* e *Aechmea*.

A propagação *in vitro* se constitui em uma alternativa tanto para a produção comercial de bromélias quanto para a sua conservação na natureza (Tamaki *et al.*, 2011). Visando avaliar a eficiência da propagação *in vitro* e *ex vitro* de plantas de *Alcantarea imperialis*, Ayoama *et al.* (2012) demonstraram a eficiência da técnica, destacando uma importante relação custo-benefício para produção. Através da micropropagação é possível obter grandes quantidades de plantas uniformes durante todo o ano, uma vez que como as plantas permanecem em cultivo sob condições controladas, não sofrem influência das variações climáticas (Rocha, 2009). *In vitro*, as plântulas crescem em ambiente controlado sob fotoperíodo fixo e baixa irradiância, umidade do ar elevada e reduzido fornecimento de nutrientes no meio de cultura, além de baixa concentração de CO<sub>2</sub> (El Atta *et al.*, 2015). Em função disso, o processo de aclimação envolve diversas técnicas que podem

auxiliar não apenas nas etapas de restabelecimento *ex vitro*, como, também, na restauração de ambientes degradados e no fornecimento de material vegetal para outras áreas de pesquisa (Pence, 2011).

A Área de Proteção Ambiental Mata do Krambeck se destaca dentre as áreas florestadas do município de Juiz de Fora em virtude de sua extensão, constituindo-se em um dos maiores fragmentos de mata urbana do Brasil. A APA Mata do Krambeck foi criada pela Lei Estadual 10943/92, abrangendo uma área de cerca de 374,1 ha. Recentemente, a área foi adquirida pela Universidade Federal de Juiz de Fora com a finalidade transformá-la em um Jardim Botânico, espaço que servirá para estudos e pesquisas relacionadas principalmente à flora e fauna. A cobertura vegetal da área é composta principalmente por uma matriz florestal, típica de Mata Atlântica, cuja tipologia é Floresta Estacional Semidecidual Montana (IBGE, 2012) que apresenta uma estrutura secundária. A Mata do Krambeck é uma comunidade arbórea em regeneração a mais de setenta anos, apresentando alta ocorrência de espécies pioneiras e secundárias iniciais (Brito, 2014).

Os primeiros trabalhos envolvendo o cultivo *in vitro* de Bromeliaceae foram desenvolvidos na década de 1970 (Mapes, 1973). Segundo Zornig (1996), quase todas as espécies de bromélias podem ser produzidas por cultura de tecidos. Nos últimos anos, diversos trabalhos relacionados ao cultivo *in vitro* de bromélias vêm sendo publicados na literatura, alguns deles envolvendo espécies ameaçadas de extinção (Carneiro & Mansur, 2004; Pompelli *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007; Galvanese *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Rech-Filho *et al.*, 2009; Freschi *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010; Dal vesco & Guerra 2011; Mollo *et al.* 2011; Kurita, 2011; Aoyama *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014; Santos, 2014). Os sistemas incluem, basicamente, a propagação por meio de germinação *in vitro* de sementes, a cultura de segmentos nodais, a cultura de folhas e a produção de sementes sintéticas (Alves *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Dal Vesco *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). A utilização de sementes é considerada a melhor opção quando se objetiva manter a variabilidade do material, contrastando-se às demais formas em que a clonagem predomina, gerando indivíduos geneticamente idênticos aos genitores, o que, por sua vez, é vantajoso para a propagação comercial de plantas ornamentais (Hartmann *et al.*, 2002).

Os meios de cultura mais empregados para o cultivo *in vitro* de Bromeliaceae são os meios de Murashige & Skoog (1962) - (MS) e de Knudson (1946) - (K), em suas formulações básicas ou diluídas. As auxinas e as citocininas, em suas formas naturais ou sintéticas, são os hormônios mais frequentemente utilizados na cultura de tecidos (Barrueto Cid & Teixeira, 2010). As citocininas pertencem a um grupo de hormônios vegetais responsáveis por processos fisiológicos muito importantes, tais como a divisão celular e o estabelecimento de drenos, assim como a translocação

de fotoassimilados para a região onde se concentram. As citocininas são sintetizadas na raiz e transportadas via xilema para outras partes da planta (Taiz & Zeiger, 2013). As auxinas são fitorreguladores que possuem ação na formação de raízes adventícias, ativação de células do câmbio e promoção do crescimento de plantas (Kerbaudy, 2012; Taiz & Zeiger, 2013). São sintetizadas em regiões de crescimento ativo, como no meristema apical do caule e nas gemas axilares ou laterais, folhas jovens e meristemas das raízes (Taiz & Zeiger, 2013). O processo de iniciação e desenvolvimento de raízes varia em sua exigência quanto ao tipo de auxina nas diferentes espécies de plantas (El Atta *et al.*, 2015). Nos estudos envolvendo o cultivo *in vitro* de bromélias, as maiores taxas de multiplicação geralmente são observadas com a combinação de BAP e ANA (Mendes *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012). Em muitos protocolos de micropropagação de bromélias o GA<sub>3</sub> tem sido utilizado para promover o alongamento de brotos (Dal Vesco & Guerra, 2010; Dal Vesco *et al.* 2011; Scherer *et al.* 2013).

O balanço adequado entre auxinas e citocininas é necessário para o estabelecimento de um controle eficiente no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro* (Andrade, 2006). Uma alta relação citocinina/auxina no meio de cultivo induz a proliferação de ramos, enquanto uma baixa relação induz a formação de raízes. Por sua vez, quantidades equimolares de auxinas e citocininas induzem a formação de calos (Taiz & Zeiger, 2013). A utilização de citocininas, como o BAP, é indispensável à divisão celular, superação da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias (Pinto, 2012). O BAP é a citocinina preferencialmente utilizada para a propagação *in vitro*, uma vez que estimula a divisão celular, bem como o alongamento das células, ativa a síntese de RNA, estimula a síntese de proteínas e atividades enzimáticas (Al Malki & Elmeer, 2010). As respostas obtidas à aplicação de reguladores de crescimento variam conforme a espécie cultivada, de acordo com as classes hormonais e com as concentrações utilizadas (Pinhal *et al.*, 2011).

A instalação *in vitro* de bancos de germoplasma de Bromeliaceae apresenta especial importância, uma vez que diversas espécies encontram-se ameaçadas de extinção (Biodiversitas, 2005; IEF, 2008; MMA, 2014) em decorrência de práticas extrativistas e da destruição e/ou degradação dos habitats naturais, o que se agrava ainda mais para as espécies endêmicas (Martinelli *et al.*, 2008). *Portea petropolitana* e *Billbergia horrida* são espécies exclusivas da Floresta Atlântica brasileira (Forzza *et al.*, 2014) e, por isso, suas populações naturais vêm sendo ameaçadas pela ação antrópica, especialmente pela fragmentação de habitats. A espécie *Billbergia horrida* caracteriza-se por apresentar roseta tubular robusta. Ocorre no leste do Brasil, desde a Bahia até o Rio de Janeiro (Versieux *et al.*, 2008). As folhas de *Billbergia horrida* são de tamanho médio e suas bainhas apresentam-se sobrepostas, formando um tanque que acumula água e detritos

em seu interior. *Portea petropolitana* é encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Versieux *et al.*, 2008). Suas folhas são longas e apresentam-se dispostas em rosetas, cujas bainhas foliares se encontram densamente sobrepostas formando tanque que acumula água e detritos. *Tilandsia polystachia* ocorre nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Paraná (Martinelli *et al.*, 2008). Destaca-se dentre as Tillandsioidea, por ser a única espécie cujas folhas formam tanque, estando elas dispostas em rosetas amplas (Kremer, 2011).

As bromélias tanque atuam como espécies-chave para a manutenção da biodiversidade e da complexidade estrutural dos mais diversificados ambientes, uma vez que a água e a matéria orgânica acumulada na base de suas folhas funcionam como abrigo, locais de procriação e fontes de alimento para diversos animais (Benzing, 2000). Em bromélias epífitas, as folhas são importantes tanto para a assimilação quanto para a absorção de nutrientes, uma vez que as raízes são pouco funcionais para essa finalidade (Takahashi *et al.*, 2007). As raízes atuam mais na fixação da epífita à planta hospedeira e à rocha do que na absorção (Benzing, 2000), embora as raízes de bromélias epífitas não sejam completamente incapazes de assimilar nutrientes (Takahashi & Mercier, 2011). Zott *et al.* (2002), sugeriram que, na maioria das bromélias tanque, em que as raízes são primariamente afuncionais e as folhas podem ter função tripla, de assimilação de carbono, absorção e armazenamento de água. Em função disso, as bromélias epífitas desenvolveram folhas que apresentam bainhas amplas e imbricadas, formando um tanque onde se acumulam água e detritos, que são absorvidos por meio de tricomas (Benzing, 2000).

As epífitas não possuem sistema radicular absorptivo eficaz, dependendo das folhas e da precipitação para seu abastecimento de água (Benzing, 1990). As folhas de uma bromélia tanque podem ser divididas em três regiões principais: a porção basal, cuja sobreposição das bainhas foliares forma o tanque, que se encontra em contato com a água e nutrientes (Benzing, 1990), e as porções mediana e apical, as quais se encontram mais expostas à luz do que a porção basal (Popp *et al.*, 2003), consistindo, portanto, no sítio de assimilação fotossintética das bromélias (Freshi *et al.*, 2010).

Diversos estudos tem demonstrado que as bromélias tanque experimentam alguma divisão funcional ao longo do comprimento de suas folhas (Olivares & Medina 1990; Medina *et al.*, 1994; Popp *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2007; Freshi *et al.*, 2010; Takahashi & Mercier 2011; Mito & Mercier 2013; Pereira *et al.*, 2013). As diferentes partes da folha de bromélias epífitas que possuem tanque podem estar expostas a condições ambientais diversas, tais como luminosidade, sombreamento, água e disponibilidade de nutrientes (Medina *et al.*, 1994; Benzing, 1990). A porção basal de folhas de bromélias recebe pouca luminosidade devido às folhas se apresentarem

estritamente imbricadas em rosetas formando o tanque. Além disso, a presença de água no tanque limita a capacidade de trocas gasosas das bases da folha com a atmosfera (Benzing, 2000). Nos períodos chuvosos, essa parte das folhas geralmente permanece submersa em água e detritos orgânicos se acumulam no interior do tanque, ao contrário da porção apical da folha, que se encontra mais exposta à luminosidade e aos gases atmosféricos. As bases das folhas se encontram sombreadas pelas lâminas de folhas superiores quando estas se dispõem em rosetas (Olivares & Medina, 1990). Segundo Freschi *et al.* (2010), a incidência de luz decresce do ápice para a base das folhas.

Vários estudos que investigaram a separação funcional em folhas de bromélias tanque detectaram maiores atividades enzimáticas e acumulação de solutos diversos na porção apical das folhas, sendo esta, portanto, uma região fisiologicamente mais ativa. Em estudo com *Ananas comosus*, Medina *et al.* (1994) detectaram maiores conteúdos de nitrogênio e de lipídios no ápice e em regiões medianas das folhas em comparação com as regiões basais. Popp *et al.* (2003) demonstraram existência de gradientes longitudinais nas concentrações de metabólitos tais como carboidratos e ácidos orgânicos nas folhas de espécies de bromélias, sendo que esses compostos se tornam mais abundantes mais próximo ao ápice foliar. Em estudo com *Vriesea gigantea*, um bromélia tanque epífita, Takahashi *et al.* (2007) detectaram atividades das enzimas sintetase da glutamina e desidrogenase do glutamato dependente de NADH significativamente maiores nos ápices foliares e, além disso, observaram maiores quantidades de tricomas e menores números de estômatos na base foliar em comparação ao ápice. Segundo esses autores, a região apical encontra-se preferencialmente envolvida com a assimilação do nitrogênio, enquanto na porção basal, ocorre a sua absorção. Mito & Mercier (2013) investigaram o modo pelo qual o ácido absícico e o óxido nítrico estão envolvidos na regulação da expressão do metabolismo MAC em plantas de *Guzmania monostachia* submetidas à seca. Os autores quantificaram o ABA, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas porções apical e basal das folhas e sugeriram que o ABA poderia ser um sinal sistêmico à seca em toda a folha. No entanto, o NO e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seriam sinais restritos respectivamente às porções apicais e basais das folhas.

Segundo Takahashi & Mercier (2011), as porções apicais das folhas apresentam maior expressão da rota fotossintética MAC, enquanto que as regiões basais exibem menor expressão desta via. Pereira *et al.* (2013), observaram um gradiente de acidez ao longo do comprimento da folha de *Guzmania monostachia* quando as plantas foram mantidas sob déficit hídrico e analisaram o envolvimento de citocininas endógenas como um possível sinal de modulação tanto da redução do NO<sub>3</sub> quanto da fixação de CO<sub>2</sub> ao longo da lâmina da folha. Takahashi & Mercier (2011), detectaram atividades das enzimas glutamina sintetase (GS), glutamato desidrogenase (NADH-

GDH), conteúdos de clorofila total e de amido significativamente maiores no ápice do que na base em folhas de *Vriesea gigantea*, sendo o teor de amido na região apical aproximadamente três vezes maior do que o encontrado na região basal.

Em estudo com *Guzmania monostachia*, Pereira *et al.* (2013) caracterizaram o padrão espacial de expressão do metabolismo MAC em resposta ao déficit hídrico. Os autores detectaram uma separação espacial clara nos processos de assimilação do nitrogênio e de redução do carbono ao longo da folha, sendo que a nitrato redutase apresentou maior atividade enzimática na porção basal da folha, enquanto a fosfoenolpiruvatocarboxilase (PEPC) e a malato desidrogenase (MDH) exibiram maior atividade na porção apical de folhas MAC induzidas. Nessa região também ocorreu maior acumulação noturna de ácidos orgânicos, principalmente dos ácidos málico e cítrico. Segundo Freschi *et al.* (2010), o déficit hídrico induz aumentos no conteúdo de ácidos orgânicos na porção apical das folhas de *G. monostachia*. Nessa região das folhas os autores observaram as maiores atividades das enzimas do metabolismo MAC. Por sua vez, a porção basal da folha apresentou níveis mais baixos de acumulação noturna de ácidos orgânicos e menores atividades das enzimas PEPC e MDH quando comparadas com o ápice.

Segundo Olivares & Medina (1990), um gradiente de maturidade se estabelece a partir do centro para a periferia em plantas que formam rosetas, assim como a partir da base para a ponta de cada folha. Variações longitudinais nos teores de água são frequentemente observadas em plantas cujas folhas se dispõem em roseta. Em *Ananas comosus*, o conteúdo absoluto de água diminui a partir da base para o ápice das folhas (Popp 2003). Em contraste, a incidência de luz decresce do ápice para a base das folhas, fazendo com que a porção apical se encontre mais exposta à luz do que a basal durante a vida útil das folhas, ocasionando um gradiente longitudinal de luz (Popp *et al.*, 2003; Freschi *et al.* 2010). A região apical é considerada, portanto, o sítio de assimilação fotossintética das bromélias (Freschi *et al.*, 2010). Cryan *et al.* (2015) estudaram as vias fotossintéticas na família Bromeliaceae e não observaram uma via fotossintética predominante, sendo 57% das espécies C3 e 43% das espécies MAC. Os resultados obtidos por esses autores mostraram um gradiente altitudinal na frequência de vias fotossintéticas, com a maioria das espécies C3 encontrados em elevações medianas (500-1500 m).

A disposição das folhas em roseta cria um ambiente de luz altamente variável. Isso ocorre devido ao fato de o ângulo de inclinação das folhas diminuir com a idade das mesmas e o autosombreamento aumentar com o número de folhas (Popp *et al.*, 2003). Segundo Freschi *et al.* (2010), as porções apicais das folhas de *Guzmania monostachia* apresentam maior expressão do metabolismo MAC, enquanto nas regiões basais relatou-se menor expressão dessa via



fotossintética. Zotz *et al.* (2002) verificaram que a taxa fotossintética na região apical de folhas de *Vriesea sanguinolenta* foi maior do que a encontrada na porção basal.

Segundo Foyer & Fletcher (2001), diversas espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas durante a fotossíntese. O oxigênio é um aceptor natural de elétrons que sobram na cadeia de transporte de elétrons (CTE) da fotossíntese, o que resulta na formação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) nos tilacóides (Veljoviû-Jovanoviû, 1998). Quando a ferredoxina se encontra muito reduzida durante o fluxo de elétrons na CTE, os elétrons podem ser transferidos do fotossistema I para o oxigênio, conduzindo à formação do radical  $O_2^{\cdot-}$ . Esse processo estimula novas reações na CTE, intensificando a geração de EROs em um processo conhecido como reação de Mehler (Panda & Khan, 2009), o que se observa principalmente sob altas intensidades luminosas (Taiz & Zeiger, 2013). A redução do  $O_2^{\cdot-}$  pode levar à produção de duas outras EROs, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (Kalaji *et al.*, 2014). Os centros de reação do PSI e PSII nos tilacóides dos cloroplastos são os principais sítios de geração de EROs (Asada, 2006). Organelas com alta atividade metabólica oxidante e elevada taxa de fluxo de elétrons, tais como cloroplastos e mitocôndrias, são as principais fontes de EROs em plantas (Mittler *et al.*, 2004; Scandalios, 2005; Ren *et al.*, 2016).

Embora necessário para o desempenho das funções celulares, o  $O_2$  conduz, inevitavelmente, à formação EROs em eventos metabólicos essenciais como a fotossíntese, respiração e fotorrespiração (Mittler *et al.*, 2002; Bhattacharjee *et al.*, 2012; Karuppanapandian *et al.*, 2011). As EROs são subprodutos de diferentes vias metabólicas e são produzidas não apenas nos cloroplastos, mas, também, nas mitocôndrias, parede celular, peroxissomas, retículo endoplasmático e na membrana plasmática (Easwar & Chaitanya, 2016). As EROs são o resultado da redução parcial do  $O_2$  atmosférico (Ren *et al.*, 2016), sendo consideradas “subprodutos inevitáveis” do metabolismo aeróbico nas plantas (Asada *et al.*, 1987; Gratão *et al.*, 2005; Moller, 2001), embora, quando se acumulam em níveis tóxicos, possam levar as células à morte (Mittler, 2002). Os estresses bióticos e abióticos provocam o aumento na geração de EROs nas plantas (Møller & Sweet Love, 2012). Em plantas submetidas a condições estressantes, tais como seca, salinidade e calor, dentre outros, a fotossíntese é um dos processos metabólicos vegetais que são mais pronunciadamente afetados, tanto de forma direta, através da restrição estomática com consequente redução na disponibilidade de  $CO_2$ , ou de forma indireta, pelo desbalanço entre a produção e a remoção de EROs produzidas durante a fotossíntese, o que conduz ao estresse oxidativo (Møller *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo decorre do aumento na geração de EROs, as quais podem oxidar as principais macromoléculas celulares e, com isso, comprometer processos fisiológicos essenciais como a fotossíntese, causando, inclusive, danos ao DNA e morte celular (Easwar & Chaitanya,

2016; Farnese, 2015). As EROs são caracterizadas como moléculas extremamente reativas que podem causar danos metabólicos irreversíveis, dentre os quais se destacam a peroxidação de lipídios, os danos às membranas celulares e a degradação de proteínas, que podem levar a perda de viabilidade celular e comprometer o desempenho e a produtividade vegetal (Mittler, 2006; Foyer *et al.*, 2009). Além disso, a peroxidação de lipídios das membranas pode resultar na perda de compartimentalização celular (Asada, 1999; Lima *et al.*, 2002).

As EROs são produtos tóxicos do metabolismo do oxigênio que também apresentam papéis importantes na regulação dos principais processos celulares, incluindo o crescimento e desenvolvimento celular, a morte celular programada e as respostas aos estresses bióticos e abióticos (Bhattacharjee *et al.*, 2012). As plantas produzem uma grande quantidade de EROs também como parte do seu metabolismo normal durante a modificação de componentes da parede celular (Smirnova *et al.*, 2014). O papel das EROs e de enzimas antioxidantes durante a embriogênese somática e organogênese também tem sido demonstrado (Gupta & Datta, 2003).

As EROs são produtos do metabolismo celular normal das células e a sua produção e eliminação é controlada por sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Kauppanapandian *et al.*, 2011). As EROs produzidas nas diversas estruturas celulares são controladas por um sistema antioxidante altamente específico que atua de maneira coordenada. Esse sistema inclui o ciclo ascorbato-glutationa, que possui inúmeros compostos antioxidantes hidrofílicos, como o ácido ascórbico e a glutatona, e enzimas antioxidantes, das quais as mais importantes são as superóxido dismutases (SOD), as catalases (CAT) e as peroxidases de ascorbato (APX) (Miller *et al.*, 2008; 2010). A produção e a eliminação das EROs nas células ocorre em um equilíbrio dinâmico, assim como a atividade das enzimas envolvidas no processo (Wang *et al.*, 2015).

As principais EROs são o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (Apel & Hirt, 2004). As plantas evoluíram um complexo sistema antioxidante para conter os prováveis efeitos deletérios das EROs (El-Shabrawi *et al.*, 2010). Independentemente da via de produção, os níveis de EROs no interior das células vegetais devem ser controlados pelos sistemas de defesa antioxidantes, visando evitar danos celulares em cadeia (Mittler *et al.*, 2004). Os pigmentos de clorofila associados ao sistema de transporte de elétrons são as principais fontes de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), que também pode surgir como subproduto da atividade da lipoxigenase (Armin *et al.* 2014). Os radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o  $^1O_2$  são as espécies moleculares mais reativas (Easwar & Chaitanya, 2016), sendo os principais causadores de danos peroxidativos aos componentes celulares. Os radicais  $O_2^{\cdot-}$  transformam-se espontaneamente em  $H_2O_2$ , embora a reação seja muito mais efetiva quando catalisada pelas superóxido dismutases (SOD). A ação conjunta das SODs e das CATs reduz o risco da formação do

radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), espécie química de elevada reatividade. Entretanto, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido representa outra espécie potencialmente tóxica que deve ser, da mesma forma, rapidamente eliminada do metabolismo (Foyer *et al.*, 1994). A ação combinada das SODs, das CATs e de PODs de diversos tipos na presença de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato, por exemplo, pode efetivamente eliminar, varrer e, ou, imobilizar espécies tóxicas de oxigênio (Scandalios, 1993; Siegel, 1993). A ação desse sistema resulta na conversão dos radicais  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , potencialmente perigosos, em água e oxigênio molecular (Scandalios, 1993).

A SOD é considerada uma enzima antioxidativa da primeira linha de defesa no combate às EROs e atua transmutando os radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Alscher *et al.*, 2002; Shafi *et al.*, 2015). A redução do  $\text{O}_2$  no PSI é o principal mecanismo de produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  nos cloroplastos (Asada, 2006). As SODs são metalo-enzimas que participam da modulação do nível de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (Mittler, 2002). As membranas fosfolipídicas são impermeáveis ao radical superóxido e, portanto, é importante que a SOD esteja no local onde o mesmo é formado (Alscher, Erturk & Heath, 2002). A CAT converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Moller, 2001). A atividade das CATs é efetiva, sobretudo, em concentrações relativamente altas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo, portanto, consideradas indispensáveis para a eliminação das EROs, principalmente em condições de estresse severo, quando os níveis de peróxido tornam-se mais elevados (Dubey, 2011). As CATs estão localizadas predominantemente nos peroxissomos, não sendo encontradas nos cloroplastos (Havir & McHale, 1987). Além da presença majoritária nos peroxissomos, as CATs possuem uma classe específica que se encontra localizada nos tecidos vacuolares, onde ela, provavelmente, está envolvida na proteção contra estresses ambientais (Willekens *et al.*, 1994).

As peroxidases (PODs) podem existir em formas solúveis ou ligadas à membrana, sendo que as formas extracelulares atuam na parede das células, onde participam da biossíntese de lignina e suberina (Van Huystee, 1987). Algumas PODs são constitutivamente expressas, enquanto outras são induzidas por estresses ambientais (Barboza *et al.*, 2014). As PODs apresentam uma distribuição mais ampla nas células do que as CATs, além de menor massa molecular (35 kDa), o que resulta em uma mobilidade mais rápida dentro dos diversos compartimentos celulares onde a sua atividade é demandada (Siegel, 1993). A ativação desses sistemas enzimáticos promove a redução nos níveis de EROs, minimizando ou evitando seus danos sobre o metabolismo celular (Breuseguem *et al.*, 2001). As PODs degradam o  $\text{H}_2\text{O}_2$  por meio da oxidação de co-substratos, tais como compostos fenólicos e/ou antioxidantes, eliminando, assim, os efeitos deletérios do  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas plantas (Asada, 2006). As PODs participam de uma ampla gama de processos fisiológicos, tais como o metabolismo das auxinas, a formação de lignina e suberina, a reticulação dos componentes da parede celular, a defesa

contra patógenos e o alongamento celular. Em função disso, a atividade das PODs é normalmente detectada durante todo o tempo de vida das plantas, desde a fase inicial de germinação até a senescência (Passardi *et al.*, 2005). As PODs existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares.

O termo isoenzima define um grupo de formas moleculares múltiplas de uma mesma enzima, que apresentam afinidade por um mesmo substrato, desempenhando a mesma atividade catalítica, embora possam apresentar diferentes propriedades cinéticas e serem separadas por processos bioquímicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Estudos têm demonstrado a existência de uma variabilidade significativa entre os padrões isoenzimáticos quando são considerados diferentes compartimentos celulares (citoplasma, mitocôndria, cloroplastos, etc.), tecidos ou estágios de desenvolvimento de uma mesma planta, assim como indivíduos de uma mesma espécie (Scandalios, 1969; Gottlieb & Weeden, 1981). A ocorrência de isoenzimas tem indicado a necessidade de formas enzimáticas mais adaptadas a determinadas situações metabólicas que podem diferir no tempo e/ou no espaço. Aparentemente, os organismos empregam múltiplas formas moleculares de certas enzimas para potencializar sua capacidade adaptativa (Markert, 1975). As isoenzimas atuam na defesa contra estresses ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos (Pedó *et al.*, 2015).

A variabilidade isoenzimática tem sido associada ao tipo de tecido e à idade de desenvolvimento, relatando-se mudanças no número ou nível de expressão, dependendo da espécie e cultivar (Scandalios, 1974; Carpin *et al.*, 1999; Lepedus *et al.*, 2005; Rudrapa *et al.*, 2005; Hilaire *et al.*, 2008). Porém, a presença ou ausência temporal e espacial das isoenzimas tem sido explicada pela regulação heterogênea ao nível de transcrição e pela ativação da enzima ou do precursor (Scandalios, 1974; Passardi *et al.*, 2005). Associado à atividade enzimática, a análise do perfil de isoenzimas tem sido utilizada em estudos que objetivam avaliar a variabilidade genética entre populações, dentre inúmeras outras finalidades. As enzimas que são codificadas por alelos diferentes ou locos gênicos diferentes frequentemente possuem mobilidades eletroforéticas distintas, de modo que essas diferenças são atribuídas a variações na composição de aminoácidos da molécula (Alfenas, 2006).

Desde que o polimorfismo genético para isoenzimas dentro de uma população foi descoberto (Stebbins & Wendel, 1989), as isoenzimas, como um dos produtos de expressão gênica, têm sido utilizadas como marcadores para estudar o desenvolvimento, diferenciação e variação de plantas (Tanksley & Orton, 1983). Marcadores isoenzimáticos, além do baixo custo e acessibilidade da técnica, geralmente fornecem ampla informação genética para diversas aplicações (Ferreira & Grattapaglia, 1998). As isoenzimas são, de maneira geral, marcadores excelentes, pois, como sua herança é co-dominante, o heterozigoto é facilmente reconhecido e a segregação pode ser

acompanhada de maneira confiável. Mudanças na sequência de bases codificadoras, na maioria dos casos, resultam em mudanças na estrutura primária da proteína correspondente. Além disso, em consequência de suas propriedades catalíticas, as enzimas, em especial as isoenzimas, podem refletir o estado metabólico e de diferenciação das células (Brammer, 2000).

Em função disso, as variações proteicas são de grande importância nos estudos genéticos como indicadores dos níveis de polimorfismo e do relacionamento filogenético (Feuser *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008), bem como na identificação de raças, espécies e populações, representando, desse modo, uma valiosa ferramenta para estudos evolutivos e taxonômicos (Izquierdo & Pinero, 2000) e, sobretudo, para o entendimento das respostas das plantas aos estresses ambientais (Bernardi *et al.*, 2004; Elmaghrabi *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2006; Kumari *et al.*, 2006; Fazeli *et al.*, 2007; Romanowska *et al.*, 2008; Saíram *et al.*, 2008; Kumutha *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Aghaleh *et al.*, 2014). As isoenzimas são produtos da expressão gênica e, conseqüentemente, são muito influenciadas pelo ambiente (Malone *et al.*, 2006). Os genes que controlam as isoenzimas se manifestam em determinadas fases do desenvolvimento, em órgãos e tecidos específicos ou sob um determinado estímulo (Ramirez *et al.*, 1991).

É descrito na literatura que o nível de expressão das isoenzimas depende dos estádios de desenvolvimento e metabólico da planta, bem como das condições ambientais as quais a planta encontra-se submetida (Bray, 1997; Reddy *et al.*, 2004; Simova-Stoilova *et al.*, 2008). Segundo Tunes *et al.* (2011), a intensidade das bandas e o perfil isoenzimático são específicos para uma determinada parte da planta, tecido e estágio de desenvolvimento. Embora alguns estudos tenham investigado a separação funcional existente ao longo das folhas de bromélias epífitas com tanque, muitos desses inclusive analisando enzimas essenciais ao metabolismo vegetal, pesquisas envolvendo os sistemas enzimáticos e isoenzimáticos antioxidativos em diferentes regiões foliares de bromélias são inexistentes até o momento.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivos analisar a atividade enzimática bruta e os perfis isoenzimáticos da catalase, peroxidase e superóxido dismutase em diferentes regiões das folhas (apical, mediana e basal) de plantas de *Billbergia horrida*, *Portea petropolitana* e *Tillandsia polystachia* estabelecidas naturalmente no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora. Nesse estudo também foram estabelecidos protocolos de multiplicação de alta eficiência com vistas a possibilitar a propagação *in vitro* em larga escala das três espécies de Bromeliaceae supracitadas.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghaleh, M.; Niknam, V.; Ebrahimzadeh, H.; Razavi, K. Antioxidative enzymes in two *in vitro* cultured *Salicornia* species in response to increasing salinity. *Biologia Plantarum*, 58: 391-394, 2014.
- Al Malki, A. H. S.; Elmeer, K. M. S. Influence of auxin and cytokinin on *in vitro* multiplication of *Ficus anastasia*. *African Journal of Biotechnology* 9: 635-639, 2010.
- Alscher, R. G.; Erturk, N.; Heath, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331-1441, 2002.
- Alves, G. M.; Dal Vesco, L. L.; Guerra, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae*, 110: 204-207, 2006.
- Andrade, W. F. Atuação de “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro*. Dissertação de Mestrado em recursos florestais, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP. 55 p., 2006.
- Anis, M.; Siddique, I.; Naz, R.; Ahmed, M. R.; Aref, I. M. Advances in micropropagation of a Highly Important *Cassia* species- New Perspectives in Plant Protection Science, 9: 191–206, 2012.
- Aoyama, E. M.; Versieux, L. M.; Nievola, C. C.; Viveiros, S. C.M. Evaluating the effectiveness of the propagation of *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivated *in vitro* and *ex vitro*. *Rodriguésia*, 63: 321-331, 2012.
- Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399, 2004.
- Armin, S.M.; Avat, S.; Pessarakli, M. Reactive oxygen species (ROS) generation and detoxifying in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 37: 1573-1585, 2014.
- Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141: 391-396, 2006.

- Asada, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 601-639, 1999.
- Asada, K.; Takahashi, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B. and Arntzen, C.J. *Photoinhibition Topics in Photosynthesis*, 9: 227-287, 1987.
- Barboza, M. R.; Silva, M. M. A.; Willadino, L.; Ulisses, C.; Camara, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, 44: 453- 460, 2014.
- Barros, J. V., Costa, A. F. O gênero *Billbergia* Thunb. (Bromeliaceae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 22: 1172-1192, 2008.
- Barrueto Cid, L. P.; Teixeira, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 18-31, 2010.
- Benzing, D.H. *Bromeliaceae: profile of na adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge. 690 p., 2000.
- Benzing, D.H. *Vascular epiphytes*. Cambridge University Press, Cambridge. 354 p., 1990.
- Bernardi, R.; Nali, C.; Ginestri, P.; Pugliesi, C.; Lorenzini, G.; Durante, M. Antioxidant enzyme isoforms on gels in two poplar clones differing in sensitivity after exposure to ozone. *Biologia Plantarum*, 48: 41-48.
- Bhattacharjee, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany*, 579-585, 2012.
- Brammer, S. P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. Documento Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 12 p., 2000.
- Bray, E. A. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2: 48-54, 1997.

- Breusegem, F.V. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 161: 405-414, 2001.
  
- Brito, P. S.; Carvalho, F. A. Estrutura e diversidade arbórea da Floresta Estacional Semidecidual secundária no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora. *Rodriguésia*, 65: 817-830, 2014.
  
- Carneiro, L.A.; Mansur, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidalia*, 2: 12-20, 2004.
  
- Carpin, S.; Crevècour, M.; Greppin, H.; Penel, C. Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiology*, 120: 799-819, 1999.
  
- Carvalho, A. C. P. P.; Santos, E. O.; Rodrigues, A. A. J. Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil. Documento 157, Embrapa, Fortaleza, CE. 43 p., 2012.
  
- Carvalho, C.P.; Hayashi, A.H.; Braga, M.R.; Nievola, C.C. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 71: 144-154, 2013.
  
- Carvalho, V.; Santos, D.S.; Nievola, C.C. *In vitro* storage under slow growth and *ex vitro* acclimatization of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea*. *South African Journal of Botany*, 92: 39-43, 2014.
  
- Chaves, M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551-560, 2009.
  
- Chu, E. P.; Tavares, A. R.; Kanashiro, S.; Giampaoli, P.; Yokota, E. S. Effects of auxins on soluble carbohydrates, starch and soluble protein content in *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 125: 451- 455, 2010.
  
- Cronquist, A. The evolution and classification of flowering plants. 2ed. The New York Botanical Garden, New York. 555 p., 1988.



- Cryan, D. M.; Winter, K.; Schulte, K.; Smith, J. A. C. Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: phylogenetic and ecological significance of CAM and C3 based on carbon isotope ratios for 1893 species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 178: 169-221, 2015.
- Dal Vesco, L. L.; Guerra, M. P. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. *Scientia Horticulturae*, 125: 748-755, 2010.
- Dal vesco, L. L.; Stefenon, V. M.; Welter, L. J.; Scherer, R. F.; Guerra, M. P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrine* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. *Scientia Horticulturae*, 128: 515-522, 2011.
- Dubey, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: Gupta, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, 9: 178-203, 2011.
- Easwar, R. D.; K. V. Chaitanya. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. *Biologia Plantarum*, 1:1-18, 2016.
- El Atta, R.; Naz M.; Anis, H.A. Micropropagation of *Cassia occidentalis* L. and the effect of irradiance on photosynthetic pigments and antioxidative enzymes. *Biologia Plantarum*, 59: 1-10, 2015.
- Elmaghrabi, A.; Ochatt, S. Isoenzymes and flow cytometry for the assessment of true-totipeness of calluses and cell suspensions of barrel medic prior to regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 85: 31-43, 2006.
- El-Shabrawi, H.; Kumar, B.; Kaul, T.; Reddy, M. K.; Silngla-Pareek, S. L.; Sopory, S. K. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. *Protoplasma*, 245: 85-96, 2010.
- Faria, D. V.; Lima, A. B. P.; Simão, M. J.; Werner, E. T.; Soares, T. C. B. Efeito de ANA e BAP no alongamento *in vitro* de *Aechmea ramosa martius* exschultes F. E *Billbergia euphemiae* e morren (bromeliaceae). *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*. 14: 466-473, 2012.

- Farnese, F. S. Sinalização celular em resposta ao arsênio: mecanismos de ação do óxido nítrico em nível molecular, bioquímico, fisiológico, ultraestrutural e implicações para fitorremediação. Tese de doutorado, Viçosa, MG, 81p., 2015.
- Fazelli, F.; Ghorbanli, M. & Niknam, V. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*, 51: 98-103, 2007.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p., 1998.
- Feuser, S.; Meler, K.; Daquinta, M.; Guerra, M. P. & Nodari, R.O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plant lets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 72: 221-227, 2003.
- Forzza, R.C.; Costa, A.; Siqueira filho, J.A. & Martinelli, G. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.
- Forzza, R.C.; Costa, A.; Siqueira Filho, J.A.; Martinelli, G., Monteiro, R.F.; Santos-Silva, F.; Saraiva, D.P.; Paixão-Souza, B. Bromeliaceae. *In* : Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014.
- Foyer, C.H.; Bloom, A.J.; Queval, G.; Noctor, G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Physiology*, 60: 455-484, 2009.
- Foyer, C.H.; Fletcher, J. M. Plant antioxidants: colour me healthy. *Biologist*, 48: 115-120, 2001.
- Foyer, C.H.; Lelandais, M.; Kunert, K.J. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92: 696-717, 1994.
- Freschi, L.; Rodrigues, M.A.; Domingues, D.S.; Purgatto, E.; Van Sylus, M.A.; Magalhães, J.R. Nitric oxide mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Journal of Plant Physiology*, 4: 1971-85, 2010.

- Fundação Biodiversitas. (Lista de espécies ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais.) [http://www.biodiversitas.org.br/cepf/edital/flora\\_iucn.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/cepf/edital/flora_iucn.pdf). 2005.
- Galvanese, M. S.; Tavares, A. R.; Aguiar, F. F. A.; Kanashiro, S.; Chu, E. P.; Stancato, G. C.; Harder, I. C. F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. Revista Ceres, 54: 63-67, 2007.
- Givnish, T.J.; Barfuss, M.H.J.; Van, E.E.; Riina, R.; Schulte, K.; Horres, R.; Gonsiska, P.A.; Jabaily, R.S.; Crayn, D.M.; Smith, A.C.; Winter, K.; Brown, G.K.; Evans, T.M.; Holst, B.K.; Luthé, H.; Till, W.; Zizka, G.; Berry, P.E.; Systma, K.J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight locus plastid phylogeny. American Journal of Botany, 98: 872-895, 2011.
- Gottlieb, L. D.; N. F. Weeden. Correlation between subcellular location and phosphoglucose isomerase variability. Evolution, 35: 1019-1022, 1981.
- Gratão, P.L.; Polle, A.; Lea, P.J.; Azevedo, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology, 32: 481-494, 2005.
- 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, 1: 233-237, 1998.
- Gupta, S. D. & Datta, S. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. Biologia Plantarum, 47: 179-183, 2003.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies Jr., F. T.; Geneve, R. L. Plant propagation: principles and practices. 880 p., 2002.
- Havir, E.A.; McHale, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiology, 84: 450-455, 1987.
- Hernández, J.A.; Cano, J; Portillo, B.; Rubio, M. & Martínez-Gómez, P. Antioxidant enzymes as biochemical markers for sharka resistance in apricot. Biologia Plantarum, 50: 400-404, 2006.

- Hilaire, K. T.; Ahipo, D. E.; Eugene, J.P.K.N; Niamké, S.; Justin, K. Y.; Mérillon, J. M. Purification and characterization of cell suspensions Peroxidase from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Applied Biochemistry and Biotechnology, 157: 575-592, 2008.
  
- 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, 105: 73-78, 2011.
  
- IBGE. Manual técnico da vegetação brasileira. Série Manuais Técnicos em Geociências. 2ª Ed. Rio de Janeiro, RJ. Num. 1. 2012.
  
- IEF- Instituto Estadual de Florestas. (Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção da flora do Estado de Minas Gerais) 2008.
  
- Izquierdo, L.Y.; Pinero, D. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). Australian Journal of Botany, 48: 645-650, 2000.
  
- Kalaji H. M., Oukarroum A., Alexandrov V., Kouzmanova M., Brestic M., Zivcak M. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. Plant Physiology and Biochemistry, 81: 16-25, 2014.
  
- Karuppanapandian, T. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Australian Journal of Crop Science, 5: 709-725, 2011.
  
- Kerbauy, G. B. Fisiologia vegetal. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431 p., 2012.
  
- Kersten, R.A. Epífitas vasculares – Histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. Hoehnea, 37: 9-38, 2010.
  
- Knudson, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin, 15: 214-217, 1946.

- Kremer, D. O gênero *Tillandsia L.* (Bromeliaceae- Tillandsioideae) no estado do Paraná, Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR. 168p., 2011.
- Kumari, G.J.; Reddy, A.M.; Naik, S.T.; Kumar, S.G.; Prasanthi, J. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. *Biologia Plantarum*, 50: 219-226, 2006.
- Kumutha, D.; Ezhilmathi, K.; Sairam, R.K.; Srivastava, G.C.; Deshmukh; P.S. & Meena, R.C. Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeon pea genotypes. *Biologia Plantarum*, 53: 75-84, 2009.
- Kurita, F.M.K. Crescimento *in vitro* da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio. Dissertação de mestrado. São Paulo, SP. 70 p., 2011.
- Lee, B.R.; Li, L.S.; Jung, W.J.; Jin; Y.L.; Avicé, J.C.; Ourry, A.; T.H. Kim. Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. *Biologia Plantarum*, 53: 505-510, 2009.
- Lepedus, H.; Jozic, M.; Stolfa, I.; Pavicic, N.; Hackenberger, B. K.; Cesar, V. Changes in peroxidase activity in the peel of unshiu mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with different storage treatments. *Food Technology Biotechnology*, 43: 71–77, 2005.
- Lima, A. L. S.; Da Matta, F. M.; Pinheiro, H. A.; Tótola, M. R.; Loureiro, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47:239-247, 2002.
- Malone, G.; Zimmer, P. D.; Castro, M. A. S.; Carvalho, I.; Meneghello, G. E.; Peske, S. T. Identificação do estágio adequado para realização de análises isoenzimáticas na caracterização de cultivares de arroz. *Revista Brasileira de Sementes*, 28: 193-200, 2006.
- Mapes, O. M. Tissue culture of bromeliads. *International Plant Propagators Society Combined Proceedings*, 23: 47-55, 1973.

- Markert, C. L. Biology of isozymes. *Bioscience*, 6: 365-368, 1975.
  
- Martinelli, G.; Vieira, C. M.; Gonzalez, M.; Leitman, P.; Piratininga, A.; Costa, A. F.; Forzza, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*, 59: 209-258, 2008.
  
- Medina, E.; Ziegler, H.; Lüttge, U.; Trimborn, P.; Francisco M. Light conditions during growth as revealed by  $^{13}\text{C}$  values of leaves of primitive cultivars of *Ananas comosus*, an obligate CAM species. *Functional Ecology*, 8: 298-305, 1994.
  
- Mendes, G.C.; Soares, C.Q.G.; Braga, V.F.; Pinto, L.C.; Santana, R.; Viccini, L.F.; Peixoto, P.H.P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia Distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 972-974, 2007.
  
- Mercier, H.; Nievola, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1: 57-62, 2003.
  
- Miller, G.; Shulaev, V.; Mittler, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133: 481-489, 2008.
  
- Miller, G.; Suzuki, N.; Ciftci-Yilmaz, S.; Mittler, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*, 33: 453-467, 2010.
  
- Ministério Do Meio Ambiente MMA. Lista Nacional Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Portaria n. 444, de 17 de dezembro de 2014. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2014.
  
- Mito, P.T.; Mercier, H. Abscisic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-regulated by drought. *Journal of Plant Physiology*, 170: 996-1002, 2013.
  
- Mitler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-409, 2002.

- Mittler, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11: 15-19, 2006.
  
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 490-498, 2004.
  
- Moller, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 561-591, 2001.
  
- Møller, I. M.; Jensen, P. E.; Hansson, A. Oxidative Modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 459-481, 2007.
  
- Møller, I.M., Sweetlove, L.J., ROS signalling – specificity is required. *Trends Plant Science*. 15: 370–374, 2012.
  
- Mollo, L.; Martins, M. C. M.; Oliveira, V. F.; Nievola, C. C.; Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 141-149, 2011.
  
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
  
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858, 2000.
  
- Olivares, E.; Medina, E. Carbon dioxide exchange, soluble carbohydrates and acid accumulation in a fructan accumulating plant: *Fourcroya humboldtiana* Treal. *Journal of experimental botany*, 41: 579-85, 1990.
  
- Paiva, P.D.O.; Naves, V.C.; Dutra, L.F.; Paiva, R.; Pasqual, M. *In Vitro* Propagation of *Nidularium fulgens* Lem. *Interciencia*, 34: 594-596, 2006.

- Panda, S. K. & Khan, M. H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vignaradiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195: 442-454, 2009.
- Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. Peroxidase have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Report*, 24: 255-265, 2005.
- Pedó, T.; Martinazzo, E. G.; Aumonde, T. Z.; Villela, F. A. Desempenho de sementes, vigor e expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob efeito da restrição hídrica. *Revista Brasileira de Biociências*, 13: 5-9, 2015.
- Pence, V. The possibilities and challenges of in vitro methods for plant conservation. *Kew Bulletin*, 65: 539-547, 2011.
- Pereira, P. N.; Purgatto, E.; Mercier, H. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmaniamonostachia* (Bromeliaceae). *Journal Plant Physiology*, 170: 1067-1074, 2013.
- Pilatti, F. K.; Aguiar, T.; Simões, T.; Benson, E. E.; Viana, A. M. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47: 82-98, 2011.
- Pinhal, H. F.; Anastácio, M. R.; Carneiro, P. A.P.; Silva, V. J.; Morais, T. P.; Luz, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural*, 41: 1136-1142, 2011.
- Pinto, F. Calogênese e indução de gemas axilares em Mogno (*Swietenia macrophylla* King). Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 88 p., 2012.
- Popp, M.; Janett, H.P.; Lüttge, U.; Medina, E. Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C<sub>3</sub> bromeliads. *New Phytologist*, 157: 649-56, 2003.
- Ramírez, H.; Calderon, A.; Rocca, W. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: Rocca W & Mroginski L (Ed.) *Cultivo de tejido en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Cali, CIAT. 825-856, 1991.



- Rech, Filho.A.; Dal Vesco, L. L.; Nodari, R. O.; Lischka, R. W.; Muller, C.V.; Guerra, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 14: 1799-1808, 2005.
- Reddy, A. R.; Chaitanya, K. V.; Vivekanandan, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1189-1202, 2004.
- Ren, J.; Sun, L. N.; Zhang, Q. Y.; Song, X. S. Drought Tolerance Is Correlated with the Activity of Antioxidant Enzymes in *Cerasus humilis* Seedlings. *BioMed Research International*, 9 p., 2016.
- Resende, C. F. Estresse oxidativo durante o cultivo in vitro de e *Pitcairnia encholirioides* L. B. SM (Bromeliaceae) após aclimatização e sob estresse hídrico. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. 118 p., 2012.
- Ribeiro, M.C. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142: 1141-1153, 2009.
- Ribeiro, M.C.; Martensen, A.C.; Metzger, J. P.; Tabarelli, M.; Scarano, F.; Fortin, M. J. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In: Zachos FE, Habel JC, editores. *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas*. Heidelberg: Springer, 405-434, 2011.
- Rocha, C. F. D.; Cogliatti-Carvalho, L.; Nunes Freitas, A. F.; Rocha-Pessôa, T. C.; Dias, A. dos S.; Ariani, C. V.; Morgado, L. N. Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. *Vidália*, 2: 52-68, 2004.
- Rocha, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: Junghans, T. G.; Souza, A. da S. (Ed.). *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2<sup>a</sup> Ed. Cruz das Almas. Embrapa, 164 p., 2009.
- Romanowska, E.; Wróblewska, B.; Drożak, A.; Zienkiewicz, M. & Siedlecka, M. Effect of Pb ions on superoxide dismutase and catalase activities in leaves of pea plants grown in high and low irradiance. *Biologia Plantarum*, 52: 80-86, 2008.

- Rudrappa, T.; Neelwarne, B.; Kumar, V.; Lakshmanan, V.; Reddampalli, S.; Gokare, R. Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). Food Chemistry, 105:1312–1320, 2005.
  
- Sairam, R.K.; Kumutha, D.; Ezhilmathi, K.; Chinnusamy, V.; Meena, R.C. Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant enzyme activities in pigeon pea. Biologia Plantarum, 53: 493-504, 2008.
  
- Santos, D. S. Influência da temperatura, ácido giberélico e cálcio no desenvolvimento de segmentos nodais *in vitro* da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto. Tese de doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, SP. 106 p., 2014.
  
- Santos, D. S.; Tamaki, V.; Nievola, C. C. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult f.) Klotzsch via nodal segments. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 46: 524-529, 2010.
  
- Santos, M. D. M.; Buso, G. C. S.; Torres, A. C. Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal] using RAPD markers. Genetics & Molecular Research, 7: 1097-1105, 2008.
  
- Scandalios, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 995-1014, 2005.
  
- Scandalios, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. A review. Biochemical Genetics, 3: 37-79, 1969.
  
- Scandalios, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology, 101: 7-12, 1993.
  
- Scandalios, J.G. Subcellular localization of catalase variants coded by two genetic loci during maize development. Journal of Heredity, 65: 28-32, 1974.

- Scherer, R.F.; Garcia, A.C.; Fraga, H.P.F.; Dal Vesco, L.L.; Steinmacher, D.A.; Guerra, M.P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, 151: 38-45, 2013.
  
- Shafi, A.; Chauhan, R.; Gill, T. Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress. *Plant Molecular Biology* 87: 615-631, 2015.
  
- Siegel, B.Z. Plant peroxidase - an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*, 12: 303-312, 1993.
  
- Silva, A.; Costa, J.L.; Alcantara, G.B.; Carvalho, G.B.; Schuck, M.R.; Bias, L.A.; Scheidt, I.G.N.; Soccol, C.R. Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. And *Nidularium procerum* Lindm (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 44:1095-1101, 2012.
  
- Silva, A.L.L.; Dornelles, E. B.; Bisognin, D. A.; Franco, E. T. H.; Horbach, M. A. Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang&Sobral – an extinction threatened bromeliad. *Iheringia Série Botânica*, 62: 9-43, 2007.
  
- Silva, A.L.L.; Franco, E.T.H.; Dornelles, E.B. & Gesing, J. P. A. Micropropagação de *Dyckia marítima* Baker – Bromeliaceae. *Iheringia Série Botânica*, 63:135-138, 2008.
  
- Simova-Stoilova, L.; Demirevska, K.; Petrova, T.; Tsenov, N.; Feller, U. Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant, Soil and Environment*, 54: 529-536, 2008.
  
- Smirnova, A.V.; Matveyeva, N.P.; Yermakov, I.P. Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cytomechanics. *Plant Biology*, 16: 252-257, 2014.
  
- Smith, L. B.; Downs, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, Hafner Press, 14: 1-658, 1974.

- Soares, J.D.R.; Araujo, A.G.; Pasqual, M.; Rodrigues, F.A.; Assis, F.A. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. *Ciência Rural*, 39: 772-777, 2009.
- Souza, B. M.; Molfetta-Machado, J. B.; Feschi, L.; Figueira, A.; Purgatto, E.; Buckeridge, M. S.; Sluys, M.A. V.; Mercier, H. Axillary bud development in pineapple nodal segments correlates with changes on cell cycle gene expression, hormone level, and sucrose and glutamate contents. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 46: 281-288, 2010.
- Stebbins, G.L.; Wendel, L. F. Introduction. In: Soltis DE & Soltis PS (eds) *Isozymes in Plant Biology* (pp 1–3). *Dioscorides Press*, Portland, Oregon, 1989.
- Stringueta, A.C.O; Silva, D.J.H.; Cardoso, A.A.; Fontes, L.E.F.; Barbosa, J.G. Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. *Acta Scientiarum Agronomy*, 27: 165-170, 2005.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918 p., 2013.
- Takahashi, C.A.; Ceccantini, G.C.T.; Mercier, H. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19: 119-26, 2007.
- Takahashi, C.A.; Mercier, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1208-16, 2011.
- Tamaki, V.; Carvalho, C.; Paula, S.M.; Kanashiro, S. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. *O Mundo da Saúde, São Paulo*. 35: 91-97, 2011.
- Tanksley, S.D.; Orton, T.J. *Isozymes in plant genetics and breeding, parts A & B*. Elsevier, Amsterdam, 1983.
- The Plant List. 2013. Version 1.1. Published on the internet. Available I <http://www.theplantlist.org/>.(access in 08/03/2016).

- Tunes L. M.; Badinelli, P. G.; Barros, A. C. S. A.; Meneghello, G. E.; Amarante, L. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. *Ceres*, 58: 178-184, 2011.
- Van Huystee, R.B. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 205–219, 1987.
- Veljoviû -Jovanoviû, Sonja. Active oxygen species and photo-synthesis: Mehler and ascorbate peroxidase reactions. *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica*, 34: 503-522, 1998.
- Versieux, L. M.; Wendt, T. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais State, Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 16: 2989-3009, 2007.
- Versieux, L. M.; Wendt, T.; Louzada, R. B.; Wanderley, M. G. L. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4: 98-110, 2008.
- Wang, M.; Wu, C.; Cheng, Z.; Meng, H. Growth and physiological changes in continuously cropped eggplant (*Solanum melongena* L.) upon relay intercropping with garlic (*Allium sativum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6: 262, 2015.
- Willekens, H.; Langebartels, C.; Tiré, C.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Van Camp, W. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 10450-10454, 1994.
- Zachos, F.; Habel, J. Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas. Heidelberg/Dordrecht/London/New York, Springer. 434p., 2011.
- Zornig, R. K. Micropropagação de bromélias. *Bromélia*, 3: 3-8, 1996.
- Zotz, G.; Reichling, P.; Valladares, F. Assimilation study on the importance of size-related changes in leaf morphology and physiology for carbon gain in an epiphytic bromeliad. *Annals of Botany*, 90: 437-43, 2002.

### **3. CAPÍTULO 1--- Artigo nas Normas da Plant Cell, Tissue and Organ Culture:**

#### **Propagação *in vitro* e análises enzimáticas em plantas de *Portea petropolitana* (Wawra) Mez.**

**Aline M. de O. Silva · Cristiano F. Resende · Vinícius P. Sacramento · Priscila F. Pinto · Cleberson Ribeiro · Acelino C. Alfenas · Paulo H. P. Peixoto**

**Resumo** - A família Bromeliaceae possui 52 gêneros que abrangem 3.320 espécies. Das espécies de bromélias, 34% são exclusivas da Mata Atlântica sendo que *Portea petropolitana* se enquadra nessa categoria. O acelerado processo de destruição dos ecossistemas, somado ao extrativismo predatório tem levado a reduções drásticas nas populações. Em função disso, a cultura de tecidos apresenta-se como uma opção bastante atrativa, pois possibilita a obtenção de taxas elevadas de multiplicação a partir de diferentes explantes. A realização de pesquisas fisiológicas com bromélias ainda é rara. Embora alguns estudos tenham investigado a separação funcional existente ao longo das folhas de bromélias epífitas com tanque, muitos deles inclusive abordando enzimas essenciais ao metabolismo vegetal, até o momento pesquisas envolvendo os sistemas enzimáticos e isoenzimáticos antioxidativos em diferentes regiões foliares de bromélias são inexistentes. Visando promover a preservação *in vitro* de plantas de *P. petropolitana*, assim como a sua multiplicação em larga escala, este estudo teve por objetivos o estabelecimento de um protocolo de multiplicação utilizando diferentes reguladores de crescimento na expectativa de determinar as concentrações ideais dos mesmos nos meios de cultura. Estudos relacionados à atividade enzimática bruta e aos perfis isoenzimáticos das enzimas catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em diferentes regiões das folhas de plantas de *P. petropolitana* mantidas em condições de campo também foram realizados. O tratamento que promoveu as maiores taxas de multiplicação *in vitro* de *P. petropolitana* foi o suplementado com BAP a 7,5 µM, no qual foram obtidas as maiores taxas de propagação. As maiores taxas de enraizamento foram observadas no tratamento suplementado com 5 µM de GA<sub>3</sub>. Padrões específicos de expressão das isoenzimas SOD e POD foram observados nas diferentes porções das folhas. A atividade da CAT não foi detectada em nenhuma das porções das folhas. O maior número de isoformas da SOD e a maior intensidade da isoforma da POD, observados na região apical das folhas, estão, aparentemente, relacionados à maior atividade metabólica resultante da maior atividade fotossintética e da maturidade fisiológica dessa porção da folha. Esses resultados foram corroborados pela maior atividade dessas enzimas observada também na porção apical das folhas empregando-se métodos espectrofotométricos. As maiores atividades enzimáticas observadas na região apical das folhas podem estar relacionadas a diferentes processos metabólicos, uma vez que essa região representa o principal sítio de

assimilação fotossintética e de biossíntese de parede celular e lignina das bromélias, processos diretamente relacionados ao acúmulo de EROs. Esta é a primeira vez na literatura que a ocorrência de atividade diferencial de enzimas antioxidativas é relatada em porções específicas de folhas de espécies de Bromeliaceae.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática, biodiversidade, eletroforese, propagação *in vitro*, regiões foliares.

---

**A. M. O. Silva · C. F. Resende · V. P. Sacramento · P. H. P. Peixoto** ✉ Plant Physiology Laboratory, Department of Botany, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Brazil; e-mail: paulo.peixoto@ufjf.edu.br; **P. F. Pinto**, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Brazil; **Cleberon Ribeiro**, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, 36570-000 Viçosa, Brazil; **Acelino C. Alfenas**, Department of Plant Pathology, Federal University of Viçosa, 36570-000 Viçosa, Brazil

## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é composta por 52 gêneros que abrangem 3.320 espécies (The Plant List, 2013). Bromeliaceae apresenta elevada riqueza, diversidade e endemismo nos domínios da Mata Atlântica, sendo a família que possui o mais alto número de espécies ameaçadas, fato que a coloca como prioridade em programas de conservação da biodiversidade (Pilatti *et al.*, 2011). Das espécies de bromélias, 34% são exclusivas da Mata Atlântica (Versieux & Wendt, 2007), sendo que *Portea petropolitana* se enquadra nessa categoria. O Bioma Mata Atlântica é uma das 35 áreas listadas como *hotspots* mundiais para a conservação da vida selvagem (Myers, 2000; Zachos & Habel, 2011). No entanto, restam apenas 11,73% da sua área original (Ribeiro *et al.*, 2009). O grau de ameaça à conservação desse bioma é alarmante, apesar dos níveis elevados de diversidade e endemismo em seus domínios (Myers, 2000; Ribeiro *et al.*, 2011). *Portea petropolitana* é uma espécie endêmica do domínio da Floresta Atlântica (Martinelli *et al.* 2008). A espécie foi enquadrada na categoria “vulnerável” no estudo de Versieux & Wendt (2007), segundo critérios estabelecidos pela IUCN (2001). *Portea petropolitana* é considerada a espécie-símbolo do Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora, por apresentar ampla ocorrência.

O acelerado processo de destruição dos ecossistemas, somado ao extrativismo predatório tem levado a reduções drásticas nas populações e à consequente perda de diversidade em Bromeliaceae

(Forzza, 2005). Em função disso, a cultura de tecidos apresenta-se como uma opção bastante atrativa, pois permite a obtenção de taxas elevadas de multiplicação a partir de diferentes tipos de explantes (Mercier & Nievola, 2003). Nos últimos anos, diversos trabalhos relacionados ao cultivo *in vitro* de bromélias vêm sendo publicados na literatura, alguns deles envolvendo espécies ameaçadas de extinção (Mendes *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010; Dal vesco & Guerra 2011; Mollo *et al.* 2011; Kurita, 2011; Aoyama *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014; Santos, 2014).

Embora necessário para o desempenho das funções celulares, o O<sub>2</sub> conduz inevitavelmente à formação de EROs em eventos metabólicos essenciais como a fotossíntese, respiração e fotorrespiração (Mittler *et al.*, 2002; Bhattacharjee, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011; Uarrota *et al.*, 2016). As EROs são resultado da redução parcial do O<sub>2</sub> atmosférico (Ren *et al.*, 2016), sendo consideradas subprodutos do metabolismo aeróbico (Asada *et al.*, 1987; Moller, 2001; Gratão *et al.*, 2005). No entanto, quando se acumulam em níveis tóxicos, elas podem levar as células à morte (Mittler, 2002). Os sistemas de defesa que promovem a eliminação das EROs envolvem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Scandalios, 1993; Mittler, 2002).

Dentre as enzimas que participam dos principais mecanismos de tolerância aos danos oxidativos nas plantas destacam-se as superóxido dismutases (SODs), as catalases (CATs) e as peroxidases (PODs) (Scandalios, 1993; Mittler, 2002; Zheng *et al.*, 2010). As SODs promovem a transmutação dos radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sendo considerada a primeira linha de defesa envolvida na neutralização das EROs (Alscher *et al.*, 2002). As enzimas CAT, POD e ascorbato-peroxidase (APX) finalizam o processo, transformando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água (Mittler, 2002). Essas enzimas podem apresentar diferentes isoenzimas. As isoenzimas atuam na defesa contra estresses ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos (Pedó *et al.*, 2015). O nível de expressão das isoenzimas depende dos estádios de desenvolvimento e metabólico da planta, bem como das condições ambientais (Bray, 1997; Reddy *et al.*, 2004; Simova-Stoilova *et al.*, 2008). Em Bromeliaceae, as folhas são o principal órgão do corpo vegetativo, exibindo tanto a função de absorção quanto de assimilação de nutrientes (Benzing, 2000). Diversos estudos tem demonstrado que as bromélias tanque experimentam alguma divisão funcional ao longo do comprimento de suas folhas (Medina *et al.*, 1994; Popp *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2007; Freschi *et al.*, 2010; Takahashi & Mercier 2011; Mioto & Mercier 2013; Pereira *et al.*, 2013). A folha de uma bromélia tanque pode ser dividida em três regiões principais: a porção basal, cuja sobreposição das folhas forma o tanque, que se encontra em contato com a água e nutrientes (Benzing, 1990), e as porções mediana e apical, as quais se encontram mais expostas à luz do que a porção basal (Popp *et al.*, 2003), constituindo o sítio de assimilação fotossintética das bromélias (Freschi *et al.*, 2010).



Segundo Freschi *et al.* (2010), a incidência de luz decresce do ápice para a base das folhas. Zotz *et al.* (2002) verificaram que a taxa fotossintética na região apical de folhas de *Vriesea sanguinolenta* foi maior do que a encontrada na porção basal. Pereira *et al.* (2013) caracterizaram o padrão espacial de expressão do metabolismo MAC em *Guzmania monostachia* em resposta ao déficit hídrico e encontraram maiores atividades das enzimas relacionadas a esse metabolismo e maior acumulação noturna de ácidos na região apical das folhas. Em estudo também realizado com *G. monostachia*, Freschi *et al.* (2010) observaram que as porções apicais apresentam maior expressão do metabolismo MAC, enquanto nas regiões basais verificou-se menor expressão dessa via fotossintética. Segundo Foyer & Fletcher (2001), as EROs são constantemente formadas durante a fotossíntese, sendo os centros de reação dos PSI e PSII nos tilacóides locais de intensa geração de EROs (Asada, 2006).

No sentido de promover a preservação *in vitro* de *Portea petropolitana*, assim como a sua multiplicação em larga escala, este estudo objetivou desenvolver protocolos de propagação *in vitro* e de aclimatização *ex vitro* dessa espécie. Visando estudar o metabolismo oxidativo em plantas de *Portea petropolitana*, no presente estudo foram investigadas as respostas dos sistemas enzimáticos das CATs, SODs e PODs em diferentes posições das folhas (apical, mediana e basal), por meio de análises espectrofotométricas e por eletroforese.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Propagação *in vitro***

Cápsulas contendo sementes de *Portea petropolitana* (Wawra) Mez foram coletadas em indivíduos estabelecidos naturalmente no Jardim Botânico da UFJF (Universidade Federal de Juiz de Fora). Após a coleta e toalete, as mesmas foram lavadas em água corrente na presença de detergente neutro. Em seguida, o material foi transferido para béqueres contendo hipoclorito de sódio a 0,3% (v/v), durante 20 minutos, em câmara de fluxo laminar. Após esse procedimento, as cápsulas foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida o material foi dissecado para a obtenção das sementes, sendo estas inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) na ½ da força dos sais, acrescido de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a 5 µM. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem, realizada à 120 °C, por 20 minutos. O material, após a inoculação em câmara de fluxo laminar, foi mantido em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (26°C ± 1°C), fotoperíodo (16-8 h) e luminosidade (40 µmoles de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Os tubos de ensaio foram observados semanalmente para verificar o aparecimento de contaminações microbiológicas, além da ocorrência de oxidação fenólica. Após o estabelecimento e estabilização *in vitro* das culturas de

*Portea petropolitana* teve início a fase de multiplicação, empregando-se o meio MS, adicionado dos reguladores de crescimento BAP, CIN, GA<sub>3</sub> ou TDZ, todos a 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µM. A avaliação do experimento foi realizada após 90 dias, sendo analisados os parâmetros: número de brotações, brotações maiores que dois cm, altura das brotações, número de raízes e presença ou ausência de calos. Adicionalmente, uma análise qualitativa foi realizada, onde três avaliadores independentes atribuíram notas que variaram de 1 a 5 aos explantes representativos de cada tratamento.

As plantas enraizadas e com partes aéreas desenvolvidas foram transferidas para bandejas de poliestireno expandido de 120 células (120 mL/célula), preenchidas com substrato comercial Plantmax Hortaliças HT® (Eucatex) umidecidas e cobertas com lâmina plástica transparente, sendo mantidas em condições controladas sob sombreamento e irrigação periódica, até a completa aclimatização. Após 35 dias, os materiais foram transferidos para casa de vegetação, com sistema automatizado de nebulização por micro-aspersão, sob plástico e sombrite® 75%, onde permaneceram por 180 dias, estando prontas para transferência para condições de campo.

Os dados obtidos no ensaio foram submetidos a análises de variância, sendo as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Gomes, 1982). As análises foram realizadas utilizando-se o programa SAEG, versão 9.1.

### **Atividade das enzimas antioxidantes**

Os extratos brutos para as determinações das atividades das catalases (CATs), das peroxidases (PODs) e das superóxido dismutases (SODs) foram obtidos pela maceração de 0,3 g de tecidos foliares em N<sub>2</sub> líquido a partir de amostras coletadas nas regiões apical, mediana e basal de folhas de indivíduos estabelecidos naturalmente em três diferentes pontos de coleta no Jardim Botânico da UFJF. As amostras foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, na presença de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e PVPP 1% (p/v) segundo Peixoto *et al.* (1999), sendo centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos, a 4°C. A atividade das CATs foi determinada após a adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30°C (Havir & McHale, 1987). O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado considerando a redução na absorvância a 240 nanômetros (nm) utilizando-se, nos cálculos, o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Anderson *et al.*, 1995). A atividade das PODs foi determinada pelo método de Kar & Mishra (1976) a partir de alíquotas de 50 µL do extrato enzimático bruto adicionadas a 4,95 mL de tampão de fosfato de potássio 25mM, pH 6,8, contendo pirogalol 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM. Após incubação por 1 minuto a 25°C, a reação foi interrompida pela adição 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% (v/v) e a absorvância da solução foi lida a 420

nm. A atividade das PODs foi estimada pela determinação da quantidade de purpurogalina formada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Chance & Maehley, 1955). A atividade das SODs foi determinada segundo Del Longo *et al.*, 1993. À mistura de reação constituída de metionina 13 mM, azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$ , EDTA 100 nM e riboflavina 2  $\mu\text{M}$ , em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente e, após 4 minutos, interrompida pelo desligamento da mesma (Giannopolitis & Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi estimada pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971). Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando BSA como padrão.

#### **Eletroforese em Gel nativo:**

Para determinação dos perfis isoenzimáticos das amostras das diferentes posições das folhas foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida (*native-PAGE*) sendo o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4% de poliacrilamida, segundo método modificado de Davis (1964). A corrida foi realizada a 4°C, sem SDS e mercaptoetanol, utilizando-se um minissistema de eletroforese vertical (Modelo Mini-Protean Tetra Cell; Bio-Rad®). A corrida foi realizada a 100V enquanto o azul de bromofenol permaneceu no gel de empilhamento e aumentada para 120 V assim que o corante alcançou o gel de separação. Nas eletroforeses foram utilizados os mesmos extratos empregados nas análises de espectrofotometria. Para a caracterização das isoenzimas da superóxido-dismutase (SOD, EC:1.15.1.1), o gel, foi incubado em tampão Tris HCl 0,5 M (pH 8,5), contendo 5 mg de riboflavina, 10 mg de brometo azul de tiazolil tetrazólio (MTT) e 150 mg de EDTA (Alfenas, 2006). Os géis foram agitados lentamente durante exposição a uma lâmpada de 15 W em transiluminador, até o aparecimento de bandas brancas em fundo violeta. As isoenzimas da peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foram caracterizadas pela incubação do gel em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), contendo 40 mg de orto-dianisidina e 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 35%. Em seguida, o gel foi incubado em estufa a 37°C até o aparecimento de bandas alaranjadas (Alfenas, 2006). As isoenzimas da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foram caracterizadas pela incubação do gel em solução contendo 0,003% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por 25 min, e posterior tratamento com solução contendo 1% (v/v) de  $\text{FeCl}_3$  e 1% (v/v) de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , por 10 min, conforme Woodbury *et al.* (1971).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação *in vitro* das sementes de *P. petropolitana* teve início 15 dias após a inoculação, com 100% de sementes germinadas e ausência de contaminação microbiana, resultado da alta eficiência dos procedimentos de desinfestação utilizados.

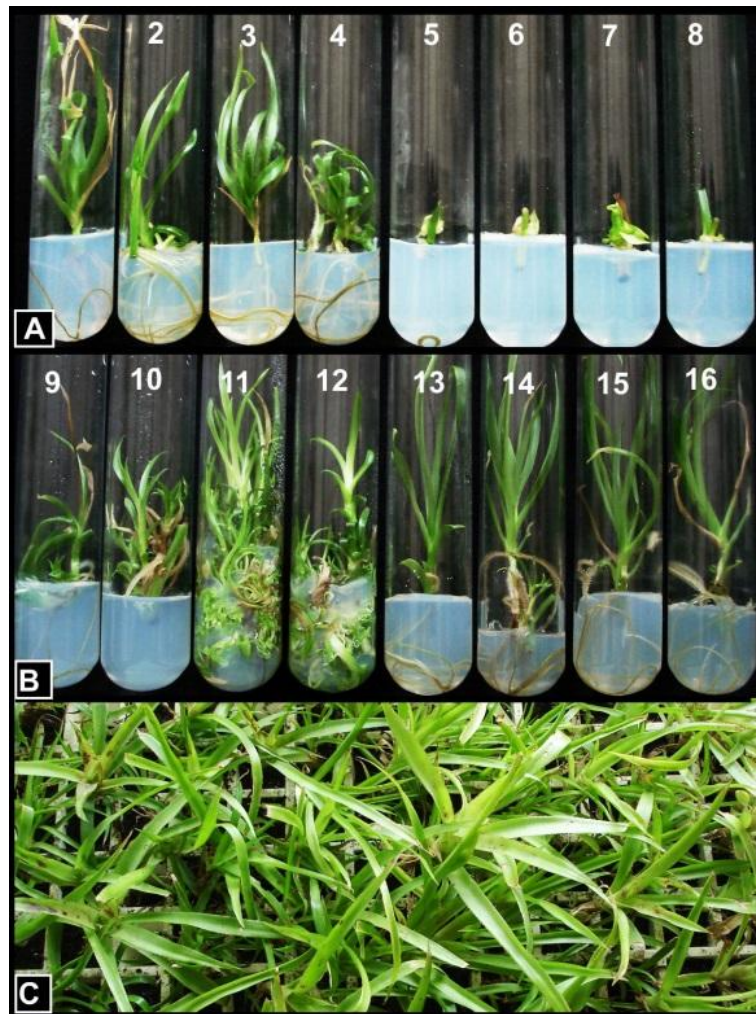
A taxa de propagação dos explantes é um parâmetro de grande relevância quando se objetiva estabelecer um protocolo eficiente de multiplicação em larga escala. A adição de BAP ao meio de cultura resultou em aumentos significativos no número de brotações produzidas em culturas de *P. petropolitana*, principalmente na concentração de 7,5 µM, na qual 20 brotações/explante foram obtidas (Tabela 1, Fig.1). Mendes *et al.* (2007), em estudo com *Billbergia distachia*, obtiveram incrementos significativos no número de brotações em resposta à 10 e 15 µM de BAP, concentrações superiores às utilizadas no presente trabalho, o que permite inferir que *P. petropolitana* é uma espécie mais prolífica e responsiva ao BAP do que *B. distachia*. Corroborando os resultados encontrados no presente estudo, Silva *et al.* (2008), trabalhando com *Dyckia maritima*, obtiveram 24 brotações em resposta a 0,5 µM de BAP. Em estudo com *Vriesea fosteriana*, Mercier & Kerbauy (1992) obtiveram 22 brotações/explante em resposta à combinação de 8,9 µM de BAP e 2,7 µM de ANA, valores bastante próximos aos encontrados no presente trabalho. Nos tratamentos em que os outros reguladores de crescimento foram adicionados ao meio de cultura, o número de brotações foi expressivamente menor (Tabela 1). Em culturas de *V. scalaris*, Silva *et al.* (2009) também observaram que o BAP foi mais eficaz do que a KIN para estimular a multiplicação de brotações, sendo 4,5 µM a concentração de BAP que resultou em uma maior proliferação das culturas, produzindo 8 brotações/explante. Segundo esses autores, concentrações mais elevadas desse regulador resultariam em taxas de multiplicação ainda mais elevadas.

**Tabela 1.** Número total de brotações em explantes de *Portea petropolitana* obtidos *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após inoculação.

Concentração (µM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	1,3 aD <sup>1</sup>	1,3 aD	1,3 bD	1,3 bD
2,5	1,3 aD	0,0 bD	3,1 bC	1,0 bD
5	1,0 aD	0,0 bD	3,6 bC	1,9 aD
7,5	1,0 aD	0,6 aD	20,0 aA	1,0 bD
10	1,6 aC	0,3 bD	13,2 aB	1,0 bD

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para as culturas de *P. petropolitana*, a adição de cinetina (KIN) ao meio de cultura não resultou em aumentos significativos no número de brotações. Por sua vez, o acréscimo de tiadizuron (TDZ) ao meio de cultura induziu a formação de calos em todas as concentrações avaliadas (Tabela 1, Fig.1). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o excesso de citocininas no meio de cultura provoca fitotoxidez, que se caracteriza pelo entufamento excessivo e alongamento deficiente das culturas, além de redução no tamanho das folhas e hiperidricidade generalizada das culturas.



**Figura 1.** Detalhes de plântulas de *P. petropolitana* cultivados *in vitro* em meio MS suplementado com CIN (1, 2, 3, 4 - **A**), TDZ (5, 6, 7, 8- **A**), BAP (9, 10, 11, 12 - **B**) e GA<sub>3</sub> (13, 14, 15, 16 - **B**), 90 dias após a inoculação. Todos os reguladores de crescimento foram adicionados, respectivamente, a 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0  $\mu$ M. Plântulas aclimatizadas de *P. Petropolitana* (**C**), 35 dias após a transferência para condições *ex vitro*.

Um maior número de brotações maiores que 2 cm também foi observado na concentração de 7,5  $\mu$ M de BAP (Tabela 2, Fig. 1). Valores intermediários foram encontrados nos tratamentos suplementados com GA<sub>3</sub> e CIN assim como em resposta às concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu$ M de BAP. Nesse aspecto, os resultados encontrados no presente trabalho diferiram daqueles relatados por

Manfio *et al.* (2010), que observaram redução no alongamento das brotações de *Orthophytum grossiorum* produzidas em resposta ao BAP durante a fase de multiplicação *in vitro*, sobretudo nas concentrações mais elevadas. O mesmo efeito foi relato por Pasqual *et al.* (2008) em estudo com *Ananas comosus var. erectifolius*.

**Tabela 2.** Número total de brotações maiores que 2 cm em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após inoculação.

Concentração (µM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	1,0 aB <sup>1</sup>	1,0 aB	1,0 bB	1,0 aB
2,5	1,3 aB	0,7 bD	1,5 bB	1,2 aB
5	1,0 aB	0,7 bD	1,3 bB	1,4 aB
7,5	1,0 aB	0,9 bC	1,9 aA	1,2 aB
10	1,0 aB	0,7 bD	1,1 bC	1,2 aB

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O enraizamento das plântulas de *Portea petropolitana* foi expressivo em resposta ao GA<sub>3</sub>. Esse regulador de crescimento, tal como as auxinas, pode estimular a iniciação e/ou o desenvolvimento de uma zona meristemática nos explantes, permitindo a formação de novas raízes (Kochiba *et al.*, 1974). Para culturas de *P. petropolitana*, um maior número de raízes foi observado em resposta à concentração de 5 µM de GA<sub>3</sub>, com 8,5 raízes/explante. Todavia, em concentrações superiores a esta houve redução na taxa de enraizamento (Tabela 3, Fig. 1). Esses resultados são similares aos encontrados por Alcântara *et al.* (2014), em estudo com cana-de açúcar e, também, por Carvalho *et al.* (1998), em estudos com *Coffea arabica*, para os quais a adição de GA<sub>3</sub> em concentrações elevadas reduziu a emergência das raízes. O mesmo efeito foi observado por Silva *et al.* (2012), trabalhando com plantas de *Nidularium innocentii*, espécie para qual o número de raízes foi maior na ausência de GA<sub>3</sub> quando comparado com as demais concentrações avaliadas. No entanto, outros autores afirmam que o GA<sub>3</sub>, em concentrações elevadas, aumenta a taxa de enraizamento em algumas culturas (Pasqual *et al.*, 1990; Diniz *et al.*, 2003). A resposta aos reguladores de crescimento é específica (Grattapaglia & Machado, 1998), e dentre outros fatores, dependente da idade das culturas e do sítio de absorção do hormônio (Raghavan & Torrey 1964).

A mesma tendência de redução no número de raízes formadas em concentrações mais elevadas de GA<sub>3</sub> também foi observada em resposta de BAP e TDZ, com maiores taxas de enraizamento nos controles do que na presença desses reguladores de crescimento. Macedo *et al.* (2003) também observaram inibição na formação de raízes em explantes de *Ananas comosus* cultivados em meio de cultura contendo BAP. Devido a sua forte interação com outros hormônios, as citocininas podem apresentar ação inibitória sobre o enraizamento, interferindo especialmente na atividade das auxinas, inibindo a divisão celular na fase de iniciação radicular (Grattapaglia & Machado, 1998).

**Tabela 3.** Número total de raízes em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração (µM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	3,7 aB <sup>1</sup>	3,7 aB	3,7 aB	3,7 bB
2,5	4,0 aB	0,9 bC	1,3 bC	5,6 bA
5	3,4 aB	0,0 cD	1,1 bC	8,5 aA
7,5	3,7 aB	0,0 cD	0,6 bC	5,7 bA
10	3,6 aB	0,1 cD	1,7 bC	4,6 bB

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Raízes mais alongadas foram obtidas em resposta aos tratamentos suplementados com GA<sub>3</sub> e nos tratamentos adicionados de CIN. Não houve diferenças entre as concentrações estudadas em respostas a esses reguladores, embora as raízes formadas na presença de GA<sub>3</sub> e CIN tenham apresentado alongamento adequado, inclusive nas concentrações mais baixas, com 7,9 e 8,2 cm, respectivamente na presença de 2,5 µM de GA<sub>3</sub> e CIN (Tabela 4, Fig. 1). Nas espécies que enraízam sem a necessidade de adição de auxinas ao meio de cultura os níveis endógenos desses reguladores de crescimento parecem já ser suficientes para a promoção do enraizamento.

Na análise qualitativa realizada (Tabela 5, Fig. 1), os tratamentos aos quais foram atribuídas as melhores notas foram aqueles suplementados com BAP, especialmente nas concentrações mais elevadas (7,5 e 10 µM). Nesses tratamentos, foram encontradas as maiores taxas de multiplicação de brotações e, no tratamento suplementado com 7,5 µM de BAP, foi observado o maior número de brotações maiores que dois centímetros, destacando essa concentração como obterá mais adequada para a obtenção de plantas com melhor desenvolvimento.

**Tabela 4.** Tamanho de raízes em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração (µM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	6,6 aA <sup>1</sup>	6,6 aA	6,6 aA	6,6 aA
2,5	7,9 aA	2,8 aB	0,0 bC	8,2 aA
5	9,0 aA	0,0 bC	0,0 bC	11,1 aA
7,5	10,1 aA	0,8 bC	0,0 bC	9,9 aA
10	1,6 aA	2,5 aB	0,0 bC	7,8 aA

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 5.** Média das notas em explantes de *Portea petropolitana* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração (µM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	2,4 bC <sup>1*</sup>	2,4 aC	2,4 bC	2,4 bC
2,5	2,8 bC	1,6 bD	1,7 cD	2,5 bC
5	3,3 aB	1,6 bD	2,3 bC	3,3 aB
7,5	3,3 aB	2,3 aC	4,8 aA	3,3 aA
10	3,3 aB	1,4 bD	4,4 aA	2,8 bC

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \*(A nota 5 equivalia a explantes de melhor qualidade enquanto a nota 1 a explantes de baixa qualidade)

### Atividade das enzimas antioxidantes

No experimento para avaliação das atividades das enzimas antioxidativas nas diferentes partes das folhas de *Portea petropolitana* foi possível observar que a atividade enzimática das peroxidase (PODs) foi maior na região apical (Tabela 6), cujos valores encontrados foram superiores aos observados nas regiões mediana e basal. Na região basal, a atividade enzimática foi intermediária e, na mediana, a atividade das PODs foi pronunciadamente menor. A atividade média das PODs na região apical das folhas foi 3,5 vezes maior que na região mediana e 20,5% maior que na região basal.



**Tabela 6.** Atividade de POD [ $\text{nmol mg}^{-1}$  (prot.)  $\text{min}^{-1}$ ], SOD [ $\text{U mg}^{-1}$  (prot.)] e de proteínas totais [ $\text{mg g}^{-1}$  (f.m.)] provenientes de três regiões foliares de *Portea petropolitana*.

Posição	POD	SOD	PROT
Apical	17,13 a	224,31 a	487,2 a
Mediana	5,24 c	205,45 b	249,6 b
Basal	14,21 b	114,28 c	151,2 c

<sup>1</sup>Nas linhas, letras maiúsculas comparam os indivíduos. Nas colunas, letras minúsculas comparam as diferentes partes das folhas. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As peroxidases convertem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio molecular. As atividades mais elevadas das PODs na região apical podem ser explicadas pela sua função metabólica de proteger os tecidos vegetais contra os efeitos tóxicos do  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado pelo metabolismo celular. Nas mitocôndrias, cloroplastos e citosol, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é gerado a partir da dismutação do ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) pela SOD. No presente estudo, nós também encontramos atividades enzimáticas elevadas das SODs na região apical das folhas de *P. petropolitana*, sugerindo a formação de quantidades mais elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nessa região. A região apical das folhas corresponde ao sítio de assimilação fotossintética das bromélias (Freschi *et al.*, 2010). Durante a fotossíntese ocorrem simultaneamente a respiração e fotorrespiração, processos envolvidos na geração de EROs (Du *et al.*, 2001).

Segundo Burnette (1977), as PODs catalisam a oxidação do álcool-coniferil, para formar radicais fenólicos que, em seguida, polimerizam-se produzindo a lignina, polímero que contribui para o fortalecimento mecânico das células. De fato, os tecidos de *P. petropolitana* são mais lignificados na região apical da folha, o que provavelmente ocorre devido à maturidade fisiológica e metabólica mais avançada dessa região em relação à basal, onde os tecidos apresentaram-se mais tenros e com maior suculência. Essas diferenças morfofisiológicas são, provavelmente, a causa da maior atividade da POD na região apical das folhas de *P. petropolitana*.

A SOD é considerada uma enzima antioxidativa de primeira linha nos mecanismos de defesa das plantas às EROs, promovendo a transmutação dos radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) à  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Alscher *et al.*, 2002). As maiores atividades das SODs foram observadas na porção apical das folhas (Tabela 6). A atividade das SODs na bainha da folha foi pronunciadamente baixa. Em média, a atividade das SODs na porção apical foi 96,3% maior que a encontrada na basal.

No presente estudo, a atividade das SODs decresceu ao longo do comprimento da folha, da região apical em direção à basal. Popp *et al.* (2003) detectaram gradientes longitudinais nas concentrações de carboidratos e de ácidos orgânicos nas folhas de bromélias, sendo que esses compostos se tornaram mais abundantes quanto mais próximo ao ápice foliar. Em estudo com

*Guzmania monostachia*, Takahashi & Mercier (2011) observaram que os conteúdos de clorofilas totais e de amido foram significativamente maiores no ápice do que na base, sendo o teor de amido aproximadamente três vezes maior do que o encontrado na porção basal. Zotz *et al.* (2002) verificaram que a taxa fotossintética na região apical de folhas de *Vriesea sanguinolenta* foi mais elevada do que a encontrada na porção basal. A região apical corresponde ao sítio de assimilação fotossintética das bromélias, sendo essa a região que recebe mais luz durante a vida útil da folha (Takahashi & Mercier, 2011). Segundo Foyer & Fletcher (2001), as EROs são formadas constantemente durante a fotossíntese. O principal mecanismo de produção de radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) nos cloroplastos ocorre em resposta à redução do  $O_2$  no PSI (Asada, 2006). Portanto, a maior atividade da SOD observada na região apical de folhas de *P. petropolitana* pode estar relacionada à maior produção de  $O_2^{\cdot-}$  gerados em resposta à atividade fotossintética, que é mais intensa nessa região da folha.

A região apical das folhas também apresentou maior conteúdo de proteínas totais que as demais porções sendo estes valores pronunciadamente superiores aos encontrados nas outras duas regiões foliares (Tabela 6). O conteúdo de proteínas decresceu da região apical da folha em direção à basal. Takahashi *et al.* (2007) verificaram diferenças na capacidade de assimilação de nitrogênio entre as porções basais e apicais de folhas de *Vriesea gigantea*. Os autores quantificaram as atividades das enzimas glutamina sintetase e glutamato desidrogenase dependente de NADH nessas regiões e sugeriram que a porção apical estaria preferencialmente envolvida com a assimilação do nitrogênio enquanto a porção basal, possivelmente, com a sua absorção.

Em estudo com *Ananas comosus*, Medina *et al.* (1994) detectaram conteúdos de nitrogênio e de lipídios mais elevados na região apical e mediana das folhas em comparação com as regiões basais. O nitrogênio é indispensável para a formação das proteínas, núcleo-proteínas e de compostos nitrogenados como aminoácidos e políptídeos (Magalhães, 1979). Desse modo, maiores conteúdos de proteínas encontrados na região apical podem estar relacionados à assimilação do nitrogênio, que ocorre preferencialmente nessa região da folha (Takahashi *et al.* (2007).

Todavia, esta é a primeira vez que se registra na literatura a ocorrência de atividade diferencial de enzimas antioxidativas em porções específicas de folhas de Bromeliacea.

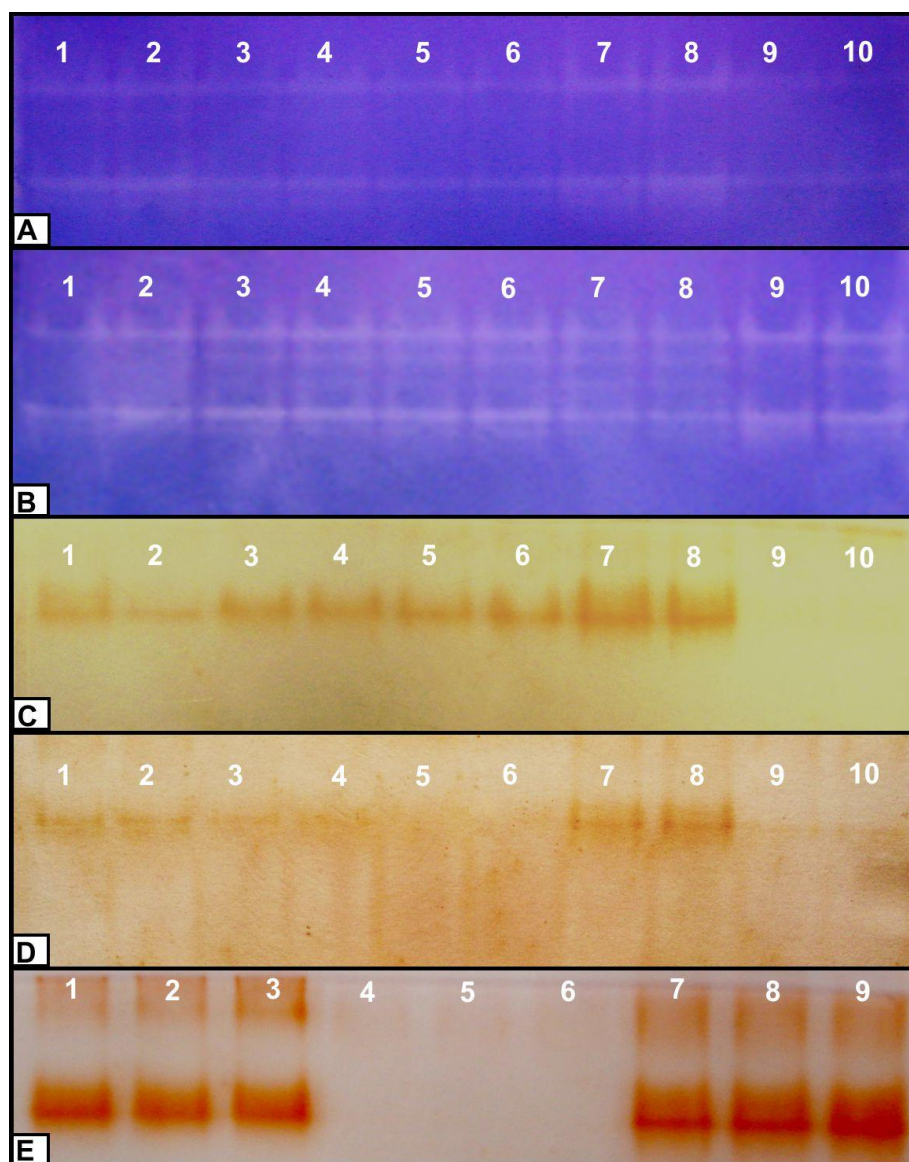
### **Perfis eletroforéticos**

Os perfis isoenzimáticos têm sido associados ao tipo de tecido utilizado e, também, à idade de desenvolvimento do tecido avaliado, com diferenças no número ou nível de expressão isoenzimático dependente da espécie e cultivar (Scandalios, 1974; Carpin *et al.*, 1999; Lepedus *et*

*al.*, 2005; Rudrapa *et al.*, 2005; Hilaire *et al.*, 2008). No presente estudo, os resultados obtidos nas análises espectrofotométricas corroboraram os resultados encontrados nas análises eletroforéticas.

A eletroforese em PAGE não-desnaturante do extrato enzimático da SOD detectou a ocorrência de três isoformas nos poços 1, 2, 3 e 4 do gel (Figura 2-A), correspondentes às amostras das porções apical (poços 1 e 2) e mediana (poços 3 e 4) das folhas do indivíduo 1, sendo essas bandas bem visíveis (Figura 2-A). Na amostra da porção basal das folhas do indivíduo 1, somente duas isoformas de SOD foram observadas (poços 5 e 6), confirmando a baixa atividade enzimática encontrada nos ensaios espectrofotométricos para essa porção das folhas em relação às demais regiões (Figura 2-A). Na região apical da folha do indivíduo 2 (poços 7 e 8), três isoformas bem visíveis foram observadas. Na porção mediana (poços 9 e 10), somente duas isoformas de menor intensidade foram visualizadas, sendo que essa região apresentou atividade (intensidade de banda) intermediária em comparação às regiões apical e basal (poços 1 e 2) das folhas (Figura 2-B).

No indivíduo 3, cinco isoformas da SOD foram detectadas na porção apical da folha (poços 3 e 4), sendo duas delas mais intensas, evidenciando uma atividade enzimática mais intensa nessa região da folha (Figura 2). Na região mediana da folha (poços 5 e 6), também foram observadas cinco isoformas, e na basal (poços 7 e 8), quatro isoformas foram visíveis, com bandas de menor intensidade que aquelas visualizadas nas amostras das regiões apical e mediana da folha (Figura 2). Os perfis isoenzimáticos da região apical das folhas dos indivíduos 1 e 3 são apresentados nos poços 9 e 10, com a revelação de três e cinco isoformas, respectivamente (Figura 2). Esse resultado mostra a ocorrência de variação nos perfis isoenzimáticos da SOD nas diferentes regiões das folhas das plantas avaliadas. As diferenças encontradas entre os indivíduos com relação ao padrão das isoenzimas da SOD sugerem diferenças genéticas e, ou de demanda metabólica, com reflexos na concentração enzimática e nos substratos nas diferentes porções da folha. As menores intensidades das bandas da SOD foram detectadas na região basal da folha do indivíduo 1 e na mediana do indivíduo 2. No indivíduo 3 foram observadas maiores intensidades das bandas e um maior número de isoformas (Figura 2). As amostras apresentaram diferentes teores de proteína, sendo que a ponta da folha sempre exibiu teores proteicos mais elevados. Provavelmente, essa maior fração da proteína total solúvel pode ter contribuído para a maior atividade isoenzimática observada nos géis dos materiais provenientes de tecidos da região apical.



**Figura 2.** Géis de poliacrilamida nativos das isoenzimas da SOD e da POD de extratos de folhas de de três indivíduos de *Portea petropolitana* estabelecidos em condições naturais. **Gel A:** Indivíduo 1: poços 1 e 2 (porção apical) poços 3 e 4 (porção mediana); poços 5 e 6 (porção basal). Indivíduo 2: poços 7 e 8 (porção apical); poços 9 e 10 (porção mediana). **Gel B:** Indivíduo 2: poços 1 e 2 (região basal). Indivíduo 3: poços 3 e 4 (porção apical); poços 5 e 6 (porção mediana); poços 7 e 8 (porção basal); Indivíduos 1 e 3: poços 9 e 10, respectivamente (porção apical). **Gel C:** Indivíduo 1: poços 1 e 2 (porção apical) poços 3 e 4 (porção mediana); poços 5 e 6 (porção basal). Indivíduo 2: poços 7 e 8 (porção apical); poços 9 e 10 (porção mediana). **Gel D:** Indivíduo 2: poços 1 e 2 (região basal). Indivíduo 3: poços 3 e 4 (porção apical); poços 5 e 6 (porção mediana); poços 7 e 8 (porção basal); Indivíduos 1 e 3: poços 9 e 10, respectivamente (porção apical). **Gel E:** Indivíduo 1 -*Portea petropolitana*: poços 1, 2 e 3 (região apical); Indivíduo 1 -*Tillandsia polystachia*: poços 4, 5 e 6 (região apical); Indivíduo 1-*Billbergia horrida*: poços 7, 8 e 9 (porção apical).

As isoenzimas variam em função dos estádios de desenvolvimento e metabólico da planta, bem como das condições ambientais (Bray, 1997; Reddy *et al.*, 2004; Simova-Stoilova *et al.*, 2008). As isoenzimas são produtos da expressão gênica e, conseqüentemente, são altamente influenciadas pelo ambiente, uma vez que os genes que controlam a sua expressão se manifestam em fases

específicas do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos ou sob um dado estímulo (Ramirez *et al.*, 1991; Malone *et al.*, 2007). Diversos estudos com espécies de bromélias têm demonstrado que algumas enzimas fundamentais ao metabolismo vegetal apresentam maiores atividades na região apical das folhas. As enzimas fosfoenolpiruvatocarboxilase (Mito & Mercier, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Freschi *et al.*, 2010) e MDH (Freschi *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2013) apresentaram maior atividade nas porções apicais de folhas de bromélias com metabolismo MAC. As enzimas glutamina sintetase e glutamato desidrogenase, relacionadas à assimilação de amônio, também apresentaram maiores atividades na região apical das folhas de bromélias (Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi & Mercier 2011). No presente estudo, nós também encontramos atividades enzimáticas mais intensas e maior número de isoformas da SOD na região apical.

Os processos metabólicos dependentes de oxigênio, como a respiração aeróbica, fotossíntese e fotorrespiração, levam à produção de EROs nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Barboza *et al.*, 2014). Nos organismos fotossintéticos, os centros de reação dos fotossistemas I e II nos tilacóides dos cloroplastos são os principais locais de geração de EROs. Os tilacóides possuem compartimentos ricos em oxigênio, moléculas redutoras e intermediários de alta energia (Asada, 2006). A região apical das folhas corresponde ao sítio de assimilação fotossintética das bromélias (Takahashi & Mercier, 2011). Os diversos processos metabólicos ocorrem de maneira mais intensa nessa região da folha e, muito provavelmente, a geração de EROs é superior nesses locais, estimulando a atividade das SODs, explicando, assim, a maior expressão de isoformas dessa enzima nessa região foliar.

Estudos sobre isoenzimas em diferentes regiões das folhas de bromélias são inexistentes. No entanto, muitos estudos têm investigado as isoenzimas da SOD em diversas espécies submetidas a estresses ambientais e relacionados à organogênese: estresse hídrico (Lee *et al.*, 2009), alagamento (Kumutha *et al.*, 2009), ozônio (Bernardi *et al.*, 2004), estresse salino (Molassiotis *et al.*, 2006; Aghaleh *et al.*, 2014), seca (Fazelli *et al.*, 2007) e analisando a organogênese (Meratan *et al.*, 2009). Diferentes estudos têm encontrado padrões específicos nas respostas das atividades de enzimas antioxidativas durante a senescência. Scebba *et al.* (2001), investigando o processo de senescência foliar em dois cultivares de *Prunus armeniaca*, reportaram uma tendência específica para cada cultivar. Um aumento gradual na atividade da SOD foi observado em um dos cultivares, enquanto, para o outro, foi encontrada redução significativa entre a segunda e a terceira amostragem. O aumento na geração de EROs devido ao envelhecimento poderia ser o responsável por essas diferenças (Bestwick *et al.*, 1997). Segundo Bernardi *et al.* (2004), foram observados padrões específicos de atividade das isoenzimas SOD, POD e CAT em relação ao genótipo, ao

desenvolvimento foliar e à exposição ao ozônio em híbridos de álamo, sendo que diferenças foram observadas entre folhas jovens e maduras quanto à presença de isoformas dessas enzimas.

A hipótese de que o envelhecimento resulta no acúmulo de radicais livres é bastante razoável. Segundo, Harmam (1981), as EROs são acumuladas de forma progressiva em resposta ao envelhecimento, o que poderia explicar os resultados encontrados no presente estudo. É possível deduzir que o fato de termos encontrado um maior número de isoformas da SOD na posição apical das folhas seja devido a essa região ser fisiologicamente mais madura e fotossinteticamente mais ativa que a mediana e a basal, o que se confirma pelas maiores atividades encontradas para essa enzima nessa porção da folha pelo método espectrofotométrico. Os resultados encontrados podem ser, portanto, resultantes do processo natural de envelhecimento foliar, o qual é mais avançado na região apical da folha. O aumento da atividade da SOD durante maturação foliar pode estar associado a processos de biossíntese de parede celular e de síntese de lignina (Van Huystee, 1987), sendo a atividade dessa enzima regulada durante o desenvolvimento (Bernardi *et al.*, 2004). A variação no número e na intensidade das isoformas da SOD nos diferentes indivíduos estudados mostra a expressão diferencial de genes que codificam essas enzimas em fases fisiológicas específicas, embora, também, sejam reflexo de variações nas condições ambientais (Alfenas, 2006).

A peroxidase (POD) é codificada por uma família multigênica apresentando variabilidade isoenzimática específica e em resposta à idade fisiológica, parte da planta, tipo de tecido e compartimento celular (Scandalios, 1974; Amiot *et al.*, 1995). A eletroforese da POD a partir de extratos enzimáticos de folhas de *Portea petropolitana* mostrou, no indivíduo 1, a presença de uma isoforma com menor intensidade para a porção apical (poços 1 e 2, Figura 2-C), não confirmando a maior atividade enzimática encontrada na análise espectrofotométrica (Tabela 6). Para a porção mediana da folha (poços 3 e 4), foi observada uma isoforma de intensidade intermediária e, para a basal (poços 5 e 6), uma banda com maior intensidade (Figura 2-C). Para o indivíduo 2, a amostra correspondente à região apical da folha (poços 7 e 8) exibiu uma isoforma com intensidade forte, confirmando a maior atividade observada nas análises de atividade bruta da enzima (Tabela 6). Para a porção mediana da folha (poços 9 e 10), não foi detectada a presença de bandas, o que pode estar associado à baixa atividade enzimática encontrada nessa região da folha.

Os poços 1 e 2 (Figura 2-D) correspondem à porção basal do indivíduo 2, nos quais foram observadas bandas de intensidade fraca. A porção apical da folha do indivíduo 3 corresponde aos poços 3 e 4, onde bandas de intensidade fraca foram observadas, assim como na porção mediana (poços 5 e 6) da folha. Em contraste, na porção basal das folhas (poços 7 e 8), bandas de intensidade forte foram detectadas.

Em estudo com diferentes cultivares de alface, Flores (2010) observou variação nos padrões isoenzimáticos da POD em resposta à posição na folha. Avaliando a organogênese *in vitro* de *Acanthophyllum sordidum*, Meratan *et al.* (2009) encontraram até cinco isoformas da POD em plântulas, raízes, calos e brotos. Todavia, trabalhando com trevo branco, Lee *et al.* (2009) observaram a presença da POD somente em folhas submetidas ao estresse hídrico por 28 dias, sendo a isoenzima ausente no controle. Aghaleh *et al.* (2014), em estudo com duas espécies de *Salicornia* cultivadas *in vitro* e submetidas a salinidade, relataram a presença de duas isoformas da POD nos géis em ambas as espécies, com expressão diferencial das isoformas em resposta à exposição à salinidade. Em estudo com macieira, Molassiotis *et al.* (2006) relataram o aumento na atividade da POD em resposta à salinidade, sendo detectadas até cinco isoformas em explantes expostos à salinidade. Fazelli *et al.* (2007) analisaram os efeitos da seca em raízes de dois cultivares de gergelim e observaram a presença de bandas similares da POD em todos os níveis de seca avaliados. Em estudo com dois híbridos de álamo com tolerância diferencial ao ozônio, Bernardi *et al.* (2004) observaram até sete isoformas da POD em folhas maduras não expostas ao ozônio, enquanto em folhas jovens somente uma isoforma foi detectada.

Na Figura 2-E, são apresentados os perfis isoenzimáticos das POD das três espécies de bromélias estudadas, sendo que nos poços 1, 2 e 3 foram aplicados extratos enzimáticos de *Portea petropolitana*, nos quais é possível observar a presença de duas isoformas bem visíveis, sendo uma de menor intensidade e a outra de intensidade forte. Nos poços 4, 5 e 6 foram aplicadas amostras de *Tillandsia polystachia*, para a qual não foi detectada atividade enzimática da POD. Nos poços 7, 8 e 9 foram aplicadas amostras de *Billbergia horrida*, para as quais foram detectadas duas isoformas bem visíveis da POD, sendo uma delas de menor intensidade e a outra de intensidade forte. Nesse gel as amostras das três espécies foram provenientes das regiões apicais das folhas.

Tal como observado no ensaio espectrofotométrico, nenhuma isoforma da catalase (CAT) foi detectada na eletroforese realizada, independentemente do indivíduo e da posição na folha.

Esta é a primeira vez que se observa na literatura a ocorrência de atividade diferencial de enzimas antioxidativas em porções específicas de folhas de Bromeliaceae.

## **CONCLUSÕES:**

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que a micropropagação é uma ferramenta eficiente para a conservação e propagação em larga escala de *P. petropolitana*, uma espécie endêmica da Mata Atlântica e vulnerável à extinção. As culturas foram introduzidas *in vitro* a partir de sementes. O tratamento que promoveu as maiores taxas de multiplicação *in vitro* foi o suplementado com BAP na concentração de 7,5  $\mu\text{M}$ . Plântulas enraizadas e prontas para a

aclimatização foram obtidas em resposta à suplementação do meio de cultura com GA<sub>3</sub> a 5 µM. As plantas foram eficientemente aclimatizadas após três meses de cultivo *in vitro*. Diferentes padrões de expressão das isoenzimas de SOD e POD foram observados nas diferentes regiões das folhas. O maior número de isoformas da SOD e a maior intensidade da isoforma da POD nas porções apicais das folhas estão associados, aparentemente, à maior atividade fotossintética e à maior maturidade fisiológica dessa porção em relação às demais, fato reafirmado pela maior atividade detectada para essas enzimas nessa região das folhas através de análises espectrofotométricas. A maior atividade dessas enzimas na região apical da folha é atribuída à maior geração de EROs durante a fotossíntese e em resposta à biossíntese de parede celular e lignina, eventos naturais observados durante o envelhecimento foliar progressivo, que é mais avançada nessa região da folha.

**Agradecimentos** - Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Apoio à Publicação da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-PROPESQ) pelo apoio financeiro. Também somos gratos ao Dr. Acelino Couto Alfenas e a Renildo de Oliveira, respectivamente, chefe e técnico de Laboratório de Patologia Molecular Florestal, Bioagro-UFV, pela importante contribuição nas análises de eletroforese. Agradecemos também aos responsáveis pelos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas do Bioagro (UFV) e Estrutura e Função de Proteínas, do Departamento de Bioquímica (UFJF).

## REFERÊNCIAS

- Aghaleh M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Razavi K (2014) Antioxidative enzymes in two *in vitro* cultured *Salicornia* species in response to increasing salinity. *Biol Plantarum* 58(2): 391-394
- Alcantara GB, Machado MP, Ribeiro DS, Wippel HH, Filho JCB, Oliveira RA, Daros E (2014) Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações *in vitro* de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. *J Biotec Biodivers* 5: 20-25
- Alfenas AC (2006) Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. Ed. UFV, Viçosa
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53: 1331-1441
- Amiot MJ, Fleuriet A, Cheynier V, Nicolas J (1995) Phenolics compounds and oxidative mechanism in fruit and vegetables. In F. A. Tomas-Barberán and R.J. Robins, eds., *Phytochemistry of fruits and vegetables*, Proceedings Phytochemical. Soc. Europe, Clarendon Press, Oxford 51-87



- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol* 109: 1247-1257
- Aoyama EM, Versieux LM, Nievola CC, Viveiros SCM (2012) Evaluating the effectiveness of the propagation of *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivated *in vitro* and *ex vitro*. *Rodriguésia*, 63: 321-331
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, pp 227–287
- Barboza MR, Silva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara TR (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural* 44: 453-460
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287
- Benzing, DH (1990) *Vascular epiphytes*. Cambridge University Press, Cambridge. 354p
- Benzing, DH (2000) *Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge. 690p
- Bernardi R, Nali C, Ginestri P, Pugliesi C, Lorenzini G, Durante M (2004) Antioxidant enzyme isoforms on gels in two poplar clones differing in sensitivity after exposure to ozone. *Biol Plantarum* 48: 41-48
- Bestwick CS, Brown IR, Benneth MHR, Mansfield JW (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9: 209–22
- Bhattacharjee S (2010) Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers p.1-30
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48-54
- Burnette FS (1977) Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *Journal of Food Sci* 42: 1-6
- Carpin S, Crèvecoeur M, Greppin H, Penel C (1999) Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol* 120: 799–819
- Carvalho GR, Pasqual M, Guimarães RJ, Mendes ANG, Antunes LEC, Silva AT (1998) Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaiá. *Pesqui Agropecu Bras* 33: 847-851

- Carvalho CP, Hayashi AH, Braga MR, Nievola CC (2013) Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 71: 144-154
- Carvalho V, Santos DS, Nievola CC (2014) *In vitro* storage under slow growth and *ex vitro* acclimatization of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea*. *South African Journal of Botany* 92: 39-43
- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Method Enzymol* 2: 764-775
- Davis BJ (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci USA* 121: 404-427
- Dal vesco, LL, Stefenon, VM, Welter, LJ, Scherer, RF, Guerra, MP (2011) Induction and scale-up of *Billbergia zebrine* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. *Scientia Horticulturae* 128: 515-522
- Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 34: 1023-1028
- Diniz JDN, Almeida JC, Teixeira ALA, Gomes ES, Hernandez FFF (2003) Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. *Ciênc agrotec* 27: 934-938
- Du, X. M. (2001) Production and scavenging of reactive species in plants. *Chinese Journal Biotechnology* 17: 121-125
- Fazelli F, Ghorbanli M, Niknam V (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biol Plantarum* 51:98-103
- Flores MEP (2010) Alocação de matéria fresca, escurecimento enzimático e processamento mínimo de alface. Tese de Doutorado UFV, Viçosa
- Forzza RC (2005) Revisão taxonômica de (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). *Bol Bot Univ São Paulo* 23: 1-49
- Foyer CH, Fletcher JM (2001) Plant antioxidants: colour me healthy. *Biologist* 48:115-120
- Freschi L, Rodrigues MA, Domingues DS, Purgatto E, Van Sylus MA, Magalhães JR, (2010) Nitric oxide mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *J Plant Physiol* 4: 1971–85
- Gomes, FP (1982) Curso de Estatística Experimental. 10ª edição. São Paulo: Nobel. 430p
- Gratão PL, Polle ALPJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32: 481-494

- Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, Brasília, 1: 233 -237
- Hilaire, K. T.; Ahipo, D. E.; Eugene, J.P.K.N; Niamké, S.; Justin, K. Y.; Mérillon, J. M. (2008) Purification and characterization of cell suspensions Peroxidase from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157: 575-592
- Harman, D (1981) The aging process. *Proc Nat Acad Sci USA* 78:7124-7128
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84: 450-455
- IUCN (2001) Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. Gland, Switzerland and Cambridge, U.K.
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57: 315-319
- Karuppanapandian T (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci* 5: 709-725
- Kochiba J, Button J, Spiegel-Roy P, Bornman CH, Kochiba M (1974) Stimulation of rooting of citrus embryoides by gibberellic acid and adenine sulphate. *Ann Bot* 38: 795-802
- Kumutha D, Ezhilmathi, K, Sairam, RK, Srivastava GC, Deshmukh PS, MEENA RC (2009) Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. *Biol Plantarum* 53: 75-84
- Kurita, FMK (2011) Crescimento *in vitro* da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio. Dissertação de mestrado. São Paulo, SP. 70 p.
- Lee BR, Li LS, Jung WJ, Jin YL, Avice JC, Ourry A, Kim TH (2009) Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. *Biol Plantarum* 53: 505-510
- Lepedus H, Gaça V, Cesar V (2005) Guaiacol peroxidases and photosynthetic pigments during maturation of spruce needles. *Croat Chem Acta* 78: 355-360
- Lowry OH, Rosebrough NJ, FARR AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Magalhães JCAJ (1979) Calagem e adubação para trigo na região do cerrado. *Informe Agropecuário* 50: 23-28
- Malone GPD, Zimmer, Castro MAS, Carvalho I, Meneghello GE, Peske ST (2007) Identificação do estágio adequado para realização de análises isoenzimáticas na caracterização de cultivares de arroz. *Rev Bras de Sem* 28: 193-200

- Manfio CE, Motoike, YS, Paula, CCC, Valente MS, Melo CG (2010) Seleção precoce *in vitro* de clones elite de uma bromélia ornamental. *Ciênc Rural* 40: 1537-1544
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59: 209-258
- Medina E, Ziegler H, Lüttge U, Trimborn P, Francisco M (1994) Light conditions during growth as revealed by  $^{13}\text{C}$  values of leaves of primitive cultivars of *Ananas comosus*, an obligate CAM species. *Funct Ecol* 8: 298–305
- Mendes GC, Soares CQG, Braga VF, Pinto LC, Santana R, Viccini LF, Peixoto PHP (2007) Multiplicação *in vitro* de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Rev Bras de Bioc* 5 :972-974
- Meratan A, Ghaffari SM, Niknam V (2009) *In vitro* organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. *Biol Plantarum* 53: 5-10
- Mercier H, Kerbauf GB (1992) *In vitro* multiplication of *Vriesea forsteriana*. *Plant Cell, Tiss Org* 30: 247-249
- Mercier H, Nievola CC (2003) Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1: 57-62
- Mioto PT, Mercier, H (2013) Abscisic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-regulated by drought. *Journal of Plant Physiology* 170: 996-1002
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-409
- Molassiotis AN, Sotiropoulos T, Tanou G, Kofidis G, Diamantidis G, Therios I (2006) Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biol Plantarum* 50: 61-68
- Moller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Phys* 52: 561-591
- Mollo, L, Martins, MCM, Oliveira, VF, Nievola, CC, Figueiredo-Ribeiro, RCL (2011) Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107: 141-149
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Myers N, Mittermeier RA, Yers, N, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858

- Pasqual M, Ribeiro VG, Ramos JD (1990) Influência do GA<sub>3</sub> e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja Natal. *Pesqui Agropecu Bras* 25: 1477-1482
- Pasqual M, Santos FC, Figueiredo MA, Junqueira MA, Rezende JC, Ferreira EA (2008) Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. *Hortic Bras* 26: 45-49
- Pedó T, Martinazzo EG, Aumonde TZ, Villela FA (2015) Desempenho de sementes, vigor e expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob efeito da restrição hídrica. *Rev Bras Bioci* 13: 5-9
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'Anna, Mosquim PR, Moreira MA(1999) Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzyme of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg* 11: 137-143
- Pereira PN, Purgatto E, Mercier H (2013) Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology* 170: 1067– 1074
- Pilatti FK, Aguiar T, Simões T, Benson EE, Viana AM (2011) *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47: 82-98
- Popp M, Janett HP, Lüttge U, Medina E (2003) Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytol* 157: 649-56
- Ramírez H, Calderon A, Rocca W (1991) Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: Rocca W & Mroginski L (Ed.) *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y plicaciones*. Cali, CIAT 825-856
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161:1189-1202
- Ren J, Sun LN, Zhang, QY, Song, XS (2016) Drought Tolerance Is Correlated with the Activity of Antioxidant Enzymes in *Cerasus humilis* Seedlings. *BioMed Research International* Volume 1, 9 p
- Resende CF (2012) Estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de e *Pitcairnia encholirioides* L. B. SM (Bromeliaceae) após aclimatização e sob estresse hídrico. *Dissertação de Mestrado-UFJF, Juiz de Fora*
- Rhagavan V, Torrey JG (1964) Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capseila* in culture. *Plant Physiol* 39: 691-99
- Ribeiro MC, Martensen AC, Metzger JP, Tabarelli M, Scarano F, Fortin MJ (2011) The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In: Zachos FE, Habel JC, editores. *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas*. Heidelberg: Springer, 405-434.

- Rudrappa T, Lakhmanan V, Kaunain R, Singara NM, Neelwarne B (2005) Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chem* 105: 1312-1320
- Santos DS (2014) Influência da temperatura, ácido giberélico e cálcio no desenvolvimento de segmentos nodais *in vitro* da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto. Tese de doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, SP. 106 p
- Scandalios JG (1974) Subcellular localization of catalase variants coded by two genetic loci during maize development. *J Hered* 65: 28-32
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 101:7-12
- Scebba F, Sebatiani L, Vitagliano C (2001) Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. *Biol Plantarum* 44: 41-46
- Silva ALL, Costa JL, Alcantara GB, Carvalho GB, Schuck MR, Bias LA, Scheidt IGN, Soccol CR (2012) Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. And *Nidularium procerum* Lindm (Bromeliaceae). *Pak J Bot* 44: 1095-1101
- Silva ALL, Franco ETH, Dornelles EB, Gesing JPA (2008) Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. *Iheringia Sér Bot* 63:135-138
- Silva ALL, Franco ETH, Dornelles EB, Reichert BCL, Quoirin M (2009) *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E, Morrem (Bromeliaceae). *Iheringia Sér Bot* 64:151-156
- Simova-Stoilova L, Demirevska K, Petrova T, Tsenov N, Feller U (2008) Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil Environ* 54: 529-536
- Souza, BM, Molfetta-Machado, JB, Feschi, L, Figueira, A, Purgatto, E, Buckeridge, MS, Sluys, MAV, Mercier, H (2010) Axillary bud development in pineapple nodal segments correlates with changes on cell cycle gene expression, hormone level, and sucrose and glutamate contents. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 46: 281-288
- Takahashi CA, Ceccantini GCT, Mercier H (2007) Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Braz J Plant Physiol* 19:119–126
- Takahashi CA, Mercier H (2011) Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *J Plant Physiol* 168: 1208-1216
- The plant list (2013) Version 1. Published on the internet. Available in <http://www.theplantlist.org/>.(access in 08/05/2016)

- Uarrota VG, Moresco R, Schmidt EC, Bouzon ZL, Nunes EC, Neubert EO, Peruch LAM, Rocha M, Maraschin M (2015) The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry* 197: 737–746
- Van Huystee, RB (1987) Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annu Rev Plant Phys* 38: 207-219
- Versieux LM, Wendt T (2007) Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais State, Brazil. *Biodivers Conserv* 16:2989-3009
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA (1971) Improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44: 301-305
- Zachos F, Habel J (2011) Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas. Springer, Heidelberg/Dordrecht/London/New York, 434p
- Zheng YX, Wu, JC, Cao FL, Zhang YP (2010) Effects of water stress on photosynthetic activity, dry mass partitioning and some associated metabolic changes in four provenances of neen (*Azadirachta indica* A. Juss). *Photosynthetica*, 48: 361-369
- Zotz G, Reichling P, Valladares F (2002) Assimilation study on the importance of size-related changes in leaf morphology and physiology for carbon gain in an epiphytic bromeliad. *Ann Bot* 90: 437-443

#### 4. CAPÍTULO 2--- Artigo nas normas da *Biologia Plantarum*:

##### **Propagação *in vitro* e análises enzimáticas em plantas de *Billbergia horrida* Regel**

A.M.O. SILVA<sup>1</sup>, C.F. RESENDE<sup>1</sup>, V.P. SACRAMENTO<sup>1</sup>, P.F. PINTO<sup>2</sup>, C. RIBEIRO<sup>3</sup>, A.C. ALFENAS<sup>4</sup> AND P.H.P. PEIXOTO<sup>1\*</sup>

*Plant Physiology Laboratory, Department of Botany, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Brazil*<sup>1</sup>

Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Brazil<sup>2</sup>

Department of General Biology, Federal University of Viçosa, 36570-000 Viçosa, Brazil<sup>3</sup>

Department of Plant Pathology, Federal University of Viçosa, 36570-000 Viçosa, Brazil<sup>4</sup>

**Resumo** - A família Bromeliaceae apresenta distribuição essencialmente neotropical sendo composta por 52 gêneros que abrangem 3.320 espécies. Das espécies de bromélias, 34% são exclusivas da Mata Atlântica sendo que *Billbergia horrida* se enquadra nessa categoria. O acelerado processo de destruição dos ecossistemas, somado ao extrativismo predatório tem levado a reduções drásticas nas populações. A cultura de tecidos apresenta-se como uma opção muito atrativa, pois proporciona a obtenção de taxas elevadas de multiplicação de mudas a partir de diferentes explantes, contribuindo para a redução nos riscos de extinção dessa espécie. Todavia, a realização de pesquisas fisiológicas envolvendo espécies de bromélias ainda é bastante limitada. O O<sub>2</sub> conduz, inevitavelmente, à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em eventos metabólicos essenciais como a fotossíntese e a respiração. Os sistemas de defesa que promovem a eliminação das EROs envolvem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Embora alguns estudos tenham investigado a separação funcional existente ao longo das folhas de bromélias epífitas com tanque, muitos deles inclusive abordando enzimas essenciais ao metabolismo vegetal, pesquisas envolvendo os sistemas enzimáticos e isoenzimáticos antioxidativos em diferentes regiões foliares de bromélias são inexistentes até o momento. No sentido de promover a preservação *in vitro* de culturas de *B. horrida* assim como a multiplicação em larga escala, este estudo teve por objetivos o estabelecimento de um protocolo de multiplicação eficiente, visando à propagação em larga escala por meio da suplementação das culturas com diferentes reguladores de crescimento. Adicionalmente, estudos relacionados à determinação da atividade enzimática bruta e dos perfis isoenzimáticos das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) em diferentes posições na folha (apical, mediana e basal) também foram realizados. O tratamento que



proporcionou as maiores taxas de multiplicação *in vitro* foi o suplementado com BAP a 2,5  $\mu\text{M}$ , no qual foi obtida a maior taxa de propagação. Plântulas com maior número de raízes foram obtidas em resposta à suplementação do meio de cultura com GA<sub>3</sub> a 2,5  $\mu\text{M}$ . Nos estudos de eletroforese, o mesmo padrão de isoformas da SOD foi observado nas três porções foliares avaliadas. Todavia, para a POD, diferentes padrões de intensidade na expressão isoenzimática foram detectados nas três partes da folha. A maior intensidade das isoformas da POD observada na porção apical das folhas parece estar relacionada à maturidade fisiológica dessa região, possibilidade corroborada pela maior atividade enzimática dessa enzima também observada por análise espectrofotométrica, empregando materiais provenientes dessa porção da folha. Durante o processo natural de senescência foliar, as PODs, juntamente com outras enzimas, estão envolvidas em processos de biossíntese de parede celular e de lignina, fenômenos diretamente ligados à maior produção e ao acúmulo de EROs nessa região da folha. Além disso, a região apical das folhas representa o sítio de assimilação fotossintética das bromélias, sendo este processo diretamente relacionado à produção de EROs. O presente estudo apresenta o primeiro relato na literatura envolvendo a ocorrência de atividade diferencial de enzimas antioxidativas em regiões específicas de folhas de Bromeliaceae.

**Palavras-chave:** atividade enzimática, biodiversidade, eletroforese, propagação *in vitro*, regiões foliares.

## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae apresenta distribuição essencialmente neotropical (Smith & Downs, 1974; Jacques-Felix, 2000), abrangendo 52 gêneros e 3.320 espécies (The Plant List, 2013). Na Mata Atlântica, a família apresenta o mais alto número de espécies ameaçadas, fato que a coloca como prioridade em programas de conservação da biodiversidade (Pilatti *et al.*, 2011). Bromeliaceae é a quarta família de angiospermas com maior riqueza de espécies no domínio Atlântico (Stehmann *et al.*, 2009). Segundo Versieux & Wendt (2007), dentre os 283 táxons de Bromeliaceae ocorrentes em Minas Gerais, mais da metade encontra-se enquadrado em alguma categoria de ameaça de extinção. O bioma Mata Atlântica é uma das 35 áreas consideradas como *hotspots* mundiais para conservação da vida selvagem (Myers, 2000) e representa um dos principais centros de diversidade e endemismo para a família Bromeliaceae (Martinelli *et al.*, 2008).

O acelerado processo de destruição dos ecossistemas, somado ao extrativismo predatório tem levado a reduções drásticas nas populações e à conseqüente perda de diversidade (Forzza, 1998; 2005). Nesse sentido, a cultura de tecidos apresenta-se como uma importante alternativa, permitindo a conservação genética das espécies e o uso sustentável de plantas (Soares *et al.*, 2009).

*Billbergia horrida* é endêmica da Mata Atlântica (Martinelli *et al.*, 2009) e apresenta ocorrência nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Forzza *et al.* 2014). A espécie cresce como epífita ou rupícola em florestas semi-decíduas e ombrófilas (Martinelli *et al.* 2009) e floresce de julho a setembro (Lima, 2008). As folhas de *Billbergia horrida* são de tamanho médio. Suas bainhas se apresentam sobrepostas e formam tanque que acumula água e detritos em seu interior. A folha é o principal órgão do corpo vegetativo das bromélias, exibindo tanto a função de absorção quanto de assimilação de nutrientes (Benzing, 2000). Segundo Zotz *et al.* (2002), na maioria das bromélias tanque, em que as raízes são primariamente afuncionais, as folhas podem ter a função tripla, de assimilação de carbono, absorção e armazenamento de água. Para isso, as bromélias epífitas desenvolveram folhas que apresentam bainhas amplas e imbricadas, formando um tanque onde se acumulam água e detritos, que são absorvidos por tricomas (Benzing 2000). Diversos estudos têm demonstrado que existe uma divisão espacial nítida de funções em uma mesma folha de bromélia (Medina *et al.*, 1994; Popp *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2007; Freschi *et al.*, 2010; Takahashi & Mercier 2011; Mioto & Mercier 2013; Pereira *et al.*, 2013). A folha de uma bromélia tanque pode ser dividida em três regiões principais: a porção basal, cuja sobreposição das bainhas foliares forma o tanque, que se encontra em contato com a água e nutrientes (Benzing, 1990), e as porções mediana e apical, as quais se encontram mais expostas à luz do que a basal (Popp *et al.*, 2003), e portanto, consistem no sítio de assimilação fotossintética das bromélias (Freschi *et al.*, 2010).

Segundo Foyer & Fletcher (2001), as espécies reativas de oxigênio (EROs) são constantemente formadas durante a fotossíntese. Os centros de reação dos PSI e PSII nos tilacóides dos cloroplastos são locais de intensa geração de EROs (Asada, 2006). As EROs são subprodutos inevitáveis do metabolismo aeróbico (Moller, 2001; Asada *et al.*, 1987; Gratão *et al.*, 2005), embora possam acumular-se nos tecidos vegetais atingindo níveis tóxicos que podem levar as células à morte (Mittler, 2002). Embora necessário para o desempenho das funções celulares, o O<sub>2</sub> conduz, inevitavelmente, à formação de EROs em eventos metabólicos normais como a fotossíntese e a respiração (Mittler *et al.*, 2002; Bhattacharjee, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011; Uarrota *et al.*, 2016). Os sistemas de defesa que promovem a eliminação das EROs podem envolver mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Kibinza *et al.*, 2011; Mittler, 2002; Scandalios, 1993). Dentre as enzimas que participam dos mecanismos de tolerância aos estresses oxidativos nas plantas destacam-se as catalases (CATs), as superóxido dismutases (SODs) e as peroxidases (PODs) (Scandalios, 1993; Mittler, 2002; Zheng *et al.*, 2010). A SOD promove a transmutação dos radicais superóxido à peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sendo considerada uma enzima antioxidativa de primeira linha de defesa para eliminação das EROs (Alscher *et al.*, 2002). Todos os organismos

aeróbicos estão propensos ao estresse oxidativo e necessitam de SODs para dismutar o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), produzindo  $H_2O_2$  (Easwar Rao & Chaitanya, 2015). As enzimas CAT, POD e ascorbato peroxidase (APX) finalizam o processo, transformando o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (Mittler, 2002).

As enzimas oxidativas podem apresentar inúmeras isoenzimas (Market e Moller, 1959). O nível de expressão das isoenzimas depende dos estádios de desenvolvimento e metabólico da planta, bem como das condições ambientais (Bray, 1997; Reddy *et al.*, 2004; Simova-Stoilova *et al.*, 2008). As isoenzimas são produtos da expressão dos genes e, portanto, são diretamente influenciadas pelo ambiente, uma vez que os genes que controlam a sua expressão se manifestam em fases específicas do desenvolvimento e em diferentes tecidos e órgãos (Ramirez *et al.*, 1991; Malone *et al.*, 2007).

As diferentes partes das folhas de bromélias que possuem tanque ficam expostas a diferentes condições ambientais, como luminosidade, sombreamento, água e disponibilidade de nutrientes (Medina *et al.*, 1994; Benzing, 1990). A porção apical da folha se encontra mais exposta à luminosidade e aos gases atmosféricos. Segundo Freschi *et al.* (2010), a incidência de luz decresce do ápice para a base das folhas. Zotz *et al.* (2002) verificaram que a taxa fotossintética na região apical de folhas de *Vriesea sanguinolenta* é maior do que a encontrada na porção basal. Freschi *et al.* (2010), em estudo com *G. monostachia*, observaram que as porções apicais das folhas apresentavam maiores densidades de estômatos e teores de clorofila, além de maiores atividades das enzimas PEPC e MDH. As porções apicais das folhas dessa espécie também apresentaram maior acidez noturna, indicando que sejam mais ativas fotossinteticamente.

A maior atividade fotossintética nos tecidos da região apical das folhas pode ocasionar uma maior produção de EROs e, conseqüentemente, uma maior atividade das enzimas antioxidativas, dessa forma, no presente estudo, foram investigadas as atividades da CAT, SOD e POD em diferentes porções das folhas (apical, mediana e basal) de *Billbergia horrida*, tanto por meio de análises espectrofotométricas quanto por eletroforese. No sentido de promover a preservação *in vitro* de *B. horrida* assim como a sua multiplicação em larga escala, este estudo também objetivou desenvolver protocolos eficientes de propagação *in vitro* e de aclimatização *ex vitro* dessa espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Propagação *in vitro***

Cápsulas contendo sementes de *Billbergia horrida* Regel foram coletadas em indivíduos estabelecidos naturalmente no Jardim Botânico da UFJF (Universidade Federal de Juiz de Fora). Após a coleta e toalete, as mesmas foram lavadas em água corrente na presença de gotas de detergente neutro. Em seguida, o material foi transferido para béqueres contendo hipoclorito de sódio a 0,3% (v/v) adicionado de duas gotas de Tween -20, durante 20 minutos, em câmara de fluxo

laminar. Após este procedimento, as cápsulas foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, o material foi dissecado para a obtenção das sementes, sendo estas inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) na ½ da força dos sais, acrescido de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a 5 µM. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem, realizada à 120 °C, por 20 minutos. O material, após a inoculação em câmara de fluxo laminar, foi mantido em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (26°C ± 1°C), fotoperíodo (16-8 h) e luminosidade (40 µmoles de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Os tubos de ensaio foram observados semanalmente visando detectar o aparecimento de contaminações microbiológicas, além da ocorrência de oxidação fenólica.

Após o estabelecimento e estabilização *in vitro* das culturas teve início a fase de multiplicação, empregando-se o meio MS adicionado dos reguladores de crescimento BAP, CIN, GA<sub>3</sub> e TDZ, todos a 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µM. Após 90 dias foi realizada a avaliação do experimento, sendo considerados os parâmetros: número de brotações, brotações maiores que dois cm, altura das brotações, número de raízes e presença ou ausência de calos. Adicionalmente, uma análise qualitativa foi realizada, sendo que três avaliadores independentes atribuíram notas que variaram de 1 a 5 aos explantes representativos de cada tratamento avaliado, sendo a nota 5 atribuída aos explantes de qualidade superior.

As plantas enraizadas e com partes aéreas desenvolvidas foram transferidas para bandejas de poliestireno expandido de 120 células (120 mL/célula), preenchidas com substrato Plantmax Hortaliças HT® (Eucatex) umedecido e cobertas com lâmina plástica transparente, mantidas sob sombreamento e irrigação periódica em condições controladas. Após 35 dias, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação, com sistema automatizado de nebulização por micro-aspersão, sob plástico e sombrite® 75%, onde permaneceram por 180 dias até a completa aclimatização.

Os dados obtidos nos ensaios de micropropagação e espectrofotometria foram submetidos à análise de variância, sendo as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Gomes, 1982). As análises foram realizadas utilizando-se o programa SAEG, versão 9.1.

### **Atividade das enzimas antioxidantes**

Os extratos brutos para as determinações das atividades das catalases (CATs), das peroxidases (PODs) e das superóxido dismutases (SODs) foram obtidos pela maceração de 0,3 g de tecidos foliares frescos em N<sub>2</sub> líquido a partir de amostras coletadas nas regiões apical, mediana e basal de folhas de indivíduos naturalmente estabelecidos em três diferentes pontos de coleta no Jardim Botânico da UFJF. As amostras foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, na presença de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto

de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e PVPP 1% (p/v), segundo Peixoto *et al.* (1999), sendo centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos, a 4°C.

A atividade das CATs foi determinada após a adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30°C (Havir e McHale, 1987). O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado considerando a redução na absorvância a 240 nanômetros (nm) utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Anderson *et al.*, 1995). A atividade das PODs foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976) a partir de alíquotas de 50 µL do extrato enzimático bruto adicionadas a 4,95 mL de tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, contendo pirogalol 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM. Após incubação por 1 minuto a 25°C, a reação foi interrompida pela adição 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% (v/v) e a absorvância da solução foi lida a 420 nm. A atividade das PODs foi estimada pela avaliação da quantidade de purpurogalina formada, utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley, 1955). A atividade das SODs foi determinada segundo 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, foram adicionados 50 µL do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25°C em câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada e, após 4 minutos, interrompida pelo desligamento da mesma (Giannopolitis & Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi estimada pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando BSA como padrão.

### **Eletroforese em gel nativo (native-PAGE):**

Para a determinação dos perfis isoenzimáticos das amostras das diferentes posições das folhas foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida nativo (*native-PAGE*) constituídos de gel de separação 10% e gel de empilhamento 4%, segundo o método modificado de Davis (1964). A corrida foi realizada a 4°C, sem adição de SDS e mercaptoetanol. Um minissistema de eletroforese vertical foi utilizado (Modelo Mini-Protean Tetra Cell; Bio-Rad®). Nas eletroforeses foram utilizados os mesmos extratos utilizados nas análises espectrofotométricas. A corrida foi realizada a 100 V enquanto o azul de bromofenol permaneceu no gel de empilhamento, sendo aumentada para 120 V assim que o corante alcançou o gel de separação. Para a caracterização das isoenzimas da

superóxido-dismutase (SOD, EC:1.15.1.1), o gel, após eletroforese em poliacrilamida (PAGE), foi incubado em tampão Tris HCl 0,5 M (pH 8,5), contendo 5 mg de riboflavina, 10 mg de brometo azul de tiazolil tetrazólio (MTT) e 150 mg de EDTA (Alfenas, 2006). Os géis foram agitados lentamente durante exposição a uma lâmpada de 15 W em transiluminador até o aparecimento de bandas brancas em fundo violeta. As isoenzimas da peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foram caracterizadas pela incubação do gel após eletroforese em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), contendo 40 mg de orto-dianisidina e 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 35%. Em seguida, o gel foi incubado em estufa a 37°C até o aparecimento de bandas alaranjadas (Alfenas, 2006). As isoenzimas da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foram caracterizadas pela incubação do gel em solução contendo 0,003% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por 25 min, e pelo posterior tratamento com solução contendo 1% (v/v) de FeCl<sub>3</sub> e 1% (v/v) de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, por 10 min, conforme descrito por Woodbury *et al.* (1971).

#### **Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE):**

Para determinação dos perfis de proteínas totais das amostras nas diferentes posições das folhas foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com Laemmli (1970). As amostras foram solubilizadas, separadamente, em tampão de amostra. Foram aplicados 60 µg de proteína por poço. A corrida foi realizada em voltagem constante de 100 V durante duas horas. Os géis foram corados com *Coomassie brilliant blue G-250*. O marcador de peso molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow (GE), cuja amplitude de pesos moleculares varia de 12 a 225 kDa.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A germinação *in vitro* das sementes de *Billbergia horrida* teve início 15 dias após a inoculação, com 100% de eficiência e ausência de contaminação microbiana, evidenciando elevada germinabilidade e a eficácia dos procedimentos de desinfestação das sementes.

Na etapa de multiplicação, a adição de BAP promoveu aumentos significativos no número de brotações (Tabela 1, Fig. 1), principalmente nas concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 µM, nas quais foram observados os valores mais elevados de brotos/explante (18,5; 18,5 e 21,9, respectivamente). Como as médias dos números de brotações não diferiram entre si, a utilização da menor concentração de BAP é a mais adequada, o que contribui para a redução dos custos de produção do meio de cultura e evita a ocorrência de hiperidricidade nos tecidos. Das citocininas disponíveis, a BAP é a mais utilizada na maioria dos trabalhos com bromélias, uma vez que é acessível e altamente eficiente na promoção da multiplicação *in vitro* em diferentes espécies (Mercier & Nievola, 2003; Pasqual *et al.*, 2008).

Em estudo realizados com *Billbergia distachia*, Mendes *et al.* (2007) relataram incrementos significativos no número de brotações em resposta à suplementação do meio de cultura com 10 e 15  $\mu\text{M}$  de BAP, concentrações superiores às utilizadas no presente trabalho. Como as culturas de *B. horrida* responderam satisfatoriamente a concentrações mais baixas de BAP, é possível inferir que essa espécie é mais prolífica que *B. distachia*. Nos tratamentos em que os outros reguladores de crescimento foram utilizados, o número de brotações foi expressivamente menor, o que demonstra a eficácia do BAP na promoção *in vitro* da multiplicação de brotações em *B. horrida*. Em culturas de *V. scalaris*, Silva *et al.* (2009) observou-se que o BAP foi mais eficaz do que a CIN para estimular a multiplicação *in vitro* das brotações, sendo 4,5  $\mu\text{M}$  a concentração que proporcionou um maior número de brotações. Os autores sugerem que concentrações mais elevadas de BAP resultariam na obtenção de taxas ainda mais elevadas de multiplicação.

Na concentração de 10  $\mu\text{M}$  de CIN foram obtidas 3,8 brotações/explante, um valor aceitável, porém muito inferior àqueles obtidos nos tratamentos suplementados com BAP (Grattapaglia & Machado, 1998). O acréscimo de TDZ ao meio de cultura promoveu a formação de calos em todas as concentrações avaliadas (Tabela 1, Fig. 1). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a adição excessiva de citocinina no meio de cultura pode causar toxidez, que se caracteriza pelo entufamento excessivo e deficiência no alongamento das culturas, além de redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e hiperidricidade generalizada. O acréscimo de  $\text{GA}_3$  também não resultou em incrementos expressivos no número de brotações para *B. horrida*, de modo que as médias não diferiram em si. Resultados similares também foram encontrados por Soares *et al.* (2009), trabalhando com o híbrido de orquídea *Hadrolaelia lobatta* x *Hidrolaelia purpuratta* Aço.

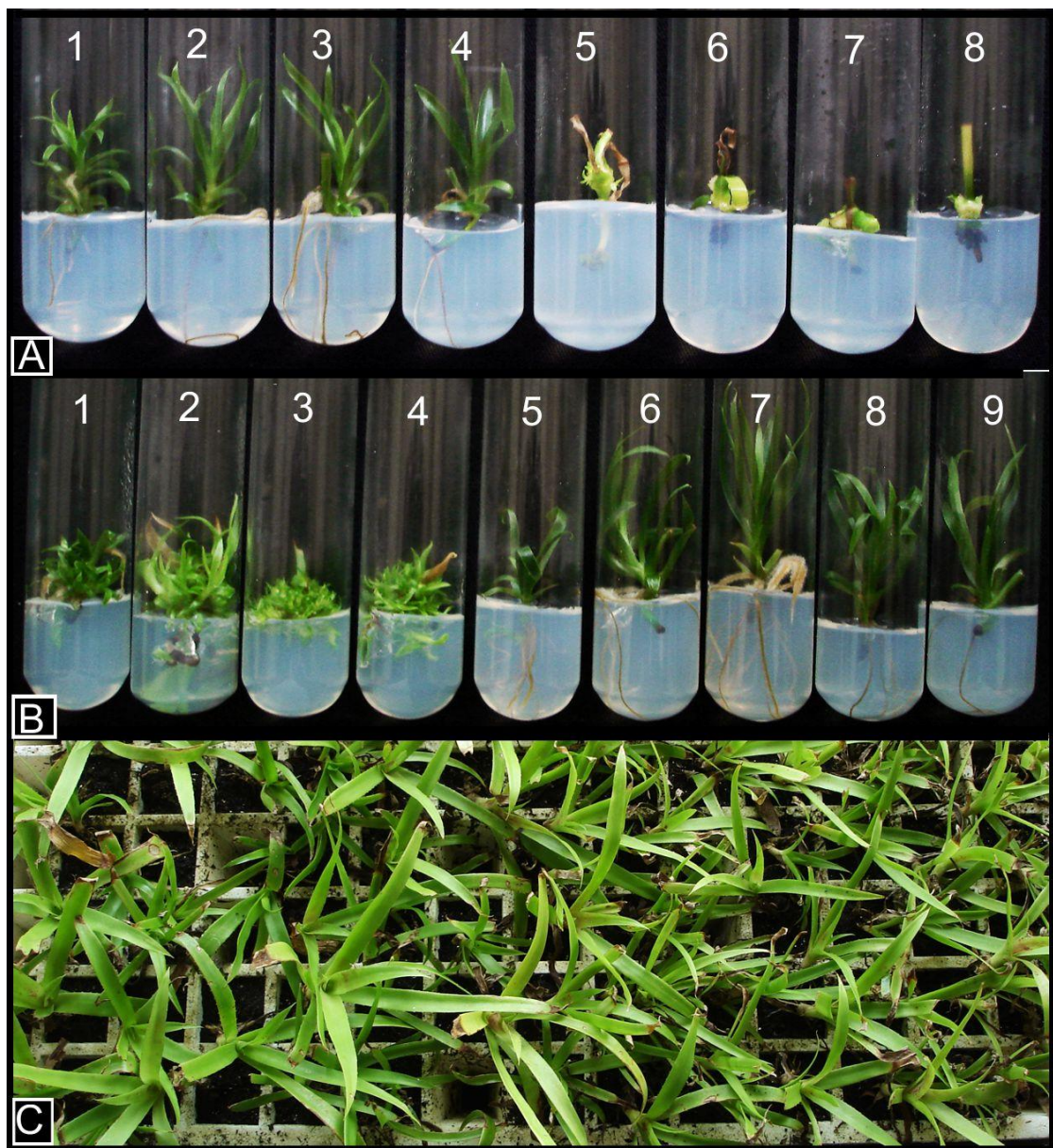
**Tabela 1.** Número de brotações em explantes de *Billbergia horrida* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e  $\text{GA}_3$ , 90 dias após a inoculação.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	CIN	TDZ	BAP	$\text{GA}_3$
0	1,0 bD <sup>1</sup>	1,0 aD	1,0 cD	1,0 bD
2,5	1,0 bD	0,0 bE	18,5 aA	1,3 aD
5	1,0 bD	0,0 bE	18,5 aA	1,0 aD
7,5	1,0 bD	0,0 bE	21,9 aA	1,0 aD
10	3,8 aC	0,3 bE	10,4 bB	1,3 aD

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Os valores mais elevados de brotações com tamanhos superiores a 2 cm foram observados em resposta à concentração de 10  $\mu\text{M}$  de CIN (Tabela 2, Fig. 1) e, também, nos tratamentos suplementados com  $\text{GA}_3$ , cujas médias não diferiram entre si. As giberelinas estão associadas à promoção do alongamento *in vitro* dos explantes em bromélias (Dal Vesco & Guerra, 2010). Os resultados obtidos neste trabalho estão em consonância com a tendência reportada por Mendes *et al.* (2007), segundo os quais, a atuação do  $\text{GA}_3$  está mais relacionada ao alongamento dos explantes de *Billbergia distachia* do que, de fato, à promoção da multiplicação das suas brotações.



**Figura 1.** Detalhes de plântulas de *B. horrida* cultivadas *in vitro* em meios MS suplementados com KIN (1, 2, 3, 4 - **A**), de TDZ (5, 6, 7, 8 - **A**), BAP (9, 10, 11, 12 - **B**) e  $\text{GA}_3$  (13, 14, 15, 16 - **B**), 90 dias após a inoculação. Todos os reguladores de crescimento estão, respectivamente, a 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0  $\mu\text{M}$ . Plântulas aclimatizadas *B. horrida* (C), 35 dias após a transferência para condições *ex vitro*.



**Tabela 2.** Número total de brotações maiores que 2 cm em explantes de *Billbergia horrida* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração (µM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	1,0 bA <sup>1</sup>	1,0 aA	1,0 aA	1,0 aA
2,5	1,0 bA	0,7 bB	0,7 bB	1,3 aA
5	1,0 bA	0,7bB	0,7 bB	1,2 aA
7,5	1,0 bA	0,7 bB	0,7 bB	1,2 aA
10	1,6 aA	0,9 bB	0,7 bB	1,3 aA

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Nos tratamentos suplementados com TDZ e com BAP, o número médio de brotações superiores a dois centímetros foi menor (Tabela 2, Fig. 1). Manfio *et al.* (2010) também observaram que a suplementação do meio de cultura com o BAP reduziu o tamanho das brotações de *Orthophytum grossiorum*. O mesmo efeito foi relato por Pasqual *et al.* (2008), em estudo com *Ananas comosus var. erectifolius*, confirmando os resultados observados no presente trabalho.

A formação de raízes em *Billbergia horrida* foi primorosa na presença de CIN e de GA<sub>3</sub> (Tabela 3). Segundo Kochiba *et al.* (1974), o GA<sub>3</sub> estimula o aparecimento e/ou desenvolvimento de zonas meristemáticas preexistente nas raízes, estimulando a rizogênese. Apesar disso, o número de raízes não diferiu entre as concentrações em resposta ao GA<sub>3</sub>. Esses resultados diferem dos obtidos por Alcântara *et al.* (2014) e por Carvalho *et al.* (1998). Em estudos, com cana-de açúcar e com café, esses autores observaram que a adição de GA<sub>3</sub> em concentrações elevadas afetou negativamente a emergência das raízes. No entanto, outros autores asseguram que o GA<sub>3</sub>, em concentrações elevadas, pode aumentar as taxas de enraizamento (Diniz *et al.*, 2003; Pasqual *et al.*, 1990). No presente trabalho, a elevação da concentração de GA<sub>3</sub> não proporcionou um incremento significativo no número de raízes, reforçando a premissa de que a resposta das culturas aos reguladores de crescimento é variável conforme a espécie (Grattapaglia & Machado, 1998), sendo também dependente da idade e do sítio de absorção do hormônio (Rhagavan & Torrey 1964).

Nos tratamentos suplementados com CIN a 2,5 e 7,5 µM foram obtidas, respectivamente, 6,3 e 4,9 brotações/explante, sendo esses valores similares aos encontrados nos tratamentos suplementados com GA<sub>3</sub>. Na presença de TDZ e de BAP, o desenvolvimento de raízes não foi observado em nenhuma das concentrações avaliadas (Tabela 3). Macedo *et al.* (2003) também observaram a inibição na formação de raízes em *Ananas comosus* cultivados em meio de cultura

suplementado com BAP. As citocininas podem inibir o enraizamento devido a sua forte interação com outros hormônios, interferindo na atividade de auxinas e inibindo a divisão celular associada à fase de iniciação da rizogênese (Grattapaglia & Machado, 1998).

**Tabela 3.** Número total de raízes em explantes de *Billbergia horrida* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração (μM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	2,6 aB	2,6 aB	2,6 aB	2,6 bB
2,5	6,3 aA	0,0 bC	0,5 bC	5,6 aA
5	3,1 aB	0,0bC	0,0 bC	4,3 aA
7,5	4,9 aA	0,0 bC	0,0 bC	6,6 aA
10	2,5 aB	0,0 bC	0,0 bC	6,3 aA

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Raízes mais longas foram obtidas nos tratamentos suplementados com GA<sub>3</sub>, especialmente nas concentrações de 5 e 7,5 μM, medindo 6,6 e 8,7 cm de comprimento, respectivamente, embora esses valores não tenham diferido em relação ao controle (Tabela 4). Silva *et al.* (2009), em estudo com *Vriesea scalaris*, encontraram as maiores taxas de enraizamento na ausência de reguladores de crescimento. Há espécies que enraízam sem necessidade de suplementação adicional com auxinas, provavelmente devido ao nível endógeno se encontrar adequado para a promoção do enraizamento.

**Tabela 4.** Tamanho de raízes em explantes de *Billbergia horrida* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração (μM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	6,6 aA <sup>1</sup>	6,6 aA	6,6 aA	6,6 aA
2,5	2,2 cB	0,0 bC	0,0 bC	3,9 bB
5	4,0 bB	0,0bC	0,0 bC	6,6 aA
7,5	3,9 bB	0,0 bC	0,0 bC	8,7 aA
10	2,8 cB	0,0 bC	0,0 bC	4,0 bB

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A análise qualitativa realizada nas culturas de *B. horrida* destacou o tratamento suplementado com 2,5 µM de BAP (Tabela 5) como o melhor, sendo esse tratamento o de maior destaque na análise quantitativa realizada para o número de brotações. Esses resultados permitem concluir que *B. horrida* possui elevado potencial de multiplicação em sistemas de cultivo *in vitro*.

**Tabela 5.** Média das notas atribuídas a explantes de *Billbergia horrida* obtidos *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após inoculação.

Concentração (µM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	2,8 bC <sup>1*</sup>	2,8 aC	2,8 cC	2,8 aC
2,5	2,4 bD	1,1 dE	4,7 aA	3,5 aB
5	3,3 aB	1,5 cD	3,9 bB	3,4 aB
7,5	2,8 bC	2,1 bD	3,8 bB	3,7 aB
10	2,8 bC	2,3 bD	3,5 bB	3,3 aB

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \*(A nota 5 foi atribuída a explantes com melhor qualidade enquanto a nota 1 a explantes de baixa qualidade).

### Atividade das enzimas antioxidantes

Quando expostas a condições bióticas ou abióticas estressantes, as plantas podem aumentar a produção de EROs, conduzindo a uma alteração no estado redox dos sistemas metabólicos, induzindo, por conseguinte, a ocorrência de estresse oxidativo (Wang *et al.* 2003). Os valores mais elevados de atividade enzimática das peroxidases (PODs) foram observados na região apical das folhas de *Billbergia horrida*, sendo esses valores superiores aos encontrados nas porções mediana e basal (Tab. 6). Por sua vez, a atividade das PODs na porção basal das folhas foi mais elevada que a encontrada na região mediana das mesmas.

Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as peroxidases podem oxidar diferentes substratos, produzindo EROs (Passardi *et al.*, 2005). Segundo Barboza *et al.* (2014), a fotorrespiração é a principal fonte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células fotossintéticas. Durante a fotossíntese ocorrem simultaneamente a respiração e a fotorrespiração, eventos que contribuem para a produção de EROs (Du *et al.*, 2001). No presente estudo, nós também encontramos atividades enzimáticas das SODs mais elevadas na região apical das folhas (Tab. 6). As SODs promovem a transmutação dos radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) gerando peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Alscher *et al.*, 2002). Muito provavelmente, quantidades elevadas de peróxido de hidrogênio foram produzidas como consequência da atividade

das SODs nessa região da folha. Usando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante, as peroxidases podem gerar espontaneamente polímeros de lignina (Lewis & Yamamoto, 1990). Segundo Burnette (1977), as PODs catalisam a oxidação álcool-coniferil, formando radicais fenólicos que, em seguida, polimerizam-se para formar a lignina, polímero que contribui para o fortalecimento mecânico das células. De fato, na região apical os tecidos são mais lignificados em comparação à região basal, onde os tecidos apresentam-se mais tenros e com maior suculência. A lignificação é uma característica associada à atividade enzimática das PODs, que foi mais elevada na região apical das folhas.

**Tabela 6.** Atividade das POD [nmol mg<sup>-1</sup> (prot.) min<sup>-1</sup>] e das SOD [U mg<sup>-1</sup> (prot.)] e de proteínas totais [mg g<sup>-1</sup> (f.m.)] provenientes de três regiões foliares de *Billbergia horrida*,.

Posição	POD	SOD	PROT
Apical	6,10 a	171,65 a	385,8 a
Mediana	2,80 c	109,71 b	286,8 b
Basal	3,64 b	66,52 c	133,3 c

<sup>1</sup>Nas linhas, letras maiúsculas comparam os indivíduos. Nas colunas, letras minúsculas comparam as diferentes partes das folhas. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os valores mais elevados de atividade enzimática das superóxido dismutases (SODs) também foram encontrados na porção apical (Tab. 6). A atividade das SODs reduziu ao longo do comprimento da folha, desde a região apical até a basal, mostrando um gradiente longitudinal de atividade enzimática, com diferenças significativas nas três regiões analisadas. A atividade enzimática da SOD na região apical das folhas foi até 158,0% maior em comparação à região basal.

A região apical consiste no sítio de assimilação fotossintética das bromélias, de modo que essa porção se encontra mais exposta à luz do que a basal (Popp *et al.*, 2003). Segundo Freschi *et al.* (2010), a incidência de luz decresce do ápice para a base das folhas. Sabe-se que as EROs são constantemente formadas durante a fotossíntese (Foyer & Fletcher, 2001), onde o oxigênio é o aceptor natural dos elétrons da cadeia de transporte de elétrons (CTE), na qual o radical superóxido é gerado nos tilacóides (Veljoviû-Jovanoviû, 1998). Durante o fluxo de elétrons na CTE, quando a ferredoxina se encontra muito reduzida, os elétrons podem ser transferidos do fotossistema I para o oxigênio, o que conduz à formação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Esse processo provoca aumento no fluxo de elétrons na cadeia, intensificando a geração de EROs em processo denominado reação de Mehler (Panda & Khan, 2009), que ocorre especialmente sob intensidades luminosas elevadas (Taiz & Zeiger, 2013). As atividades mais elevadas da SOD na região apical podem ser explicadas pela

sua função metabólica de proteção dos tecidos vegetais contra os efeitos tóxicos do radical superóxido gerado na fotossíntese, que é mais intensa nessa região da folha.

Takahashi & Mercier (2011) encontraram conteúdos de clorofilas totais e de amido significativamente maiores na região apical das folhas de *Vriesea gigantea*, sendo o teor de amido aproximadamente três vezes maior do que o armazenado na porção basal. Zotz *et al.* (2002) verificaram que a taxa fotossintética na região apical de folhas de *Vriesea sanguinolenta* foi maior do que a encontrada na porção basal. Pereira *et al.* (2013) caracterizaram o padrão espacial de expressão do metabolismo MAC em *Guzmania monostachia* em resposta ao déficit hídrico. Eles observaram que a PEPC e a MDH exibiram maiores atividades na porção apical de folhas MAC induzidas. Nessa região também ocorreu maior acumulação noturna de ácidos orgânicos, principalmente dos ácidos málico e cítrico. Em estudo com *Vriesea gigantea*, um bromélia tanque epífita, Takahashi *et al.* (2007) detectaram menores quantidades de tricomas e maior densidade estomática no ápice foliar em comparação à base da folha. Os resultados obtidos nos estudos citados evidenciam uma tendência de a região apical das folhas ser fotossinteticamente mais ativa. Em função disso, a geração de EROs ocorre de modo mais intenso nessa parte da folha, conduzindo a maiores atividades das enzimas oxidativas, como, de fato, se verificou em nosso estudo. Todavia, a atividade das catalases (CATs) não foi detectada em nenhum dos três indivíduos avaliados, independentemente da região analisada das folhas.

No presente estudo, conteúdos de proteínas mais elevados foram encontrados na região apical das folhas, sendo 189,4% maiores que o observado na região basal. Em nosso estudo, nós verificamos uma redução no conteúdo de proteínas desde a porção apical em direção à basal (Tab. 6), caracterizando, de modo semelhante ao observado para a SOD, um gradiente longitudinal no conteúdo de proteínas. Takahashi & Mercier (2011) verificaram a existência de diferenças na assimilação de nitrogênio entre as porções basais e apicais de folhas de *Vriesea gigantea*. Os autores quantificaram as atividades das enzimas glutamina sintetase e glutamato desidrogenase nessas regiões e sugeriram que a região apical estaria, preferencialmente, envolvida com a assimilação do nitrogênio enquanto a porção basal atuaria na absorção desse elemento. O nitrogênio é essencial para a formação das proteínas, núcleo-proteínas e outros compostos como aminas, aminoácidos e políptídeos (Magalhães, 1979). Em estudo com *Ananas comosus*, Medina *et al.* (1994) detectaram maiores conteúdos de nitrogênio e de lipídios nas regiões apicais e medianas das folhas em comparação com as regiões basais. Possivelmente, os maiores conteúdos de proteínas encontrados na região apical das folhas de *Billbergia horrida* podem estar relacionados aos mecanismos de assimilação do nitrogênio, que ocorrem preferencialmente nessa região da folha,

conforme observado por Takahashi & Mercier (2011). Estudos relacionados à avaliação do conteúdo de proteínas em diferentes regiões foliares de bromélias são inexistentes até o momento.

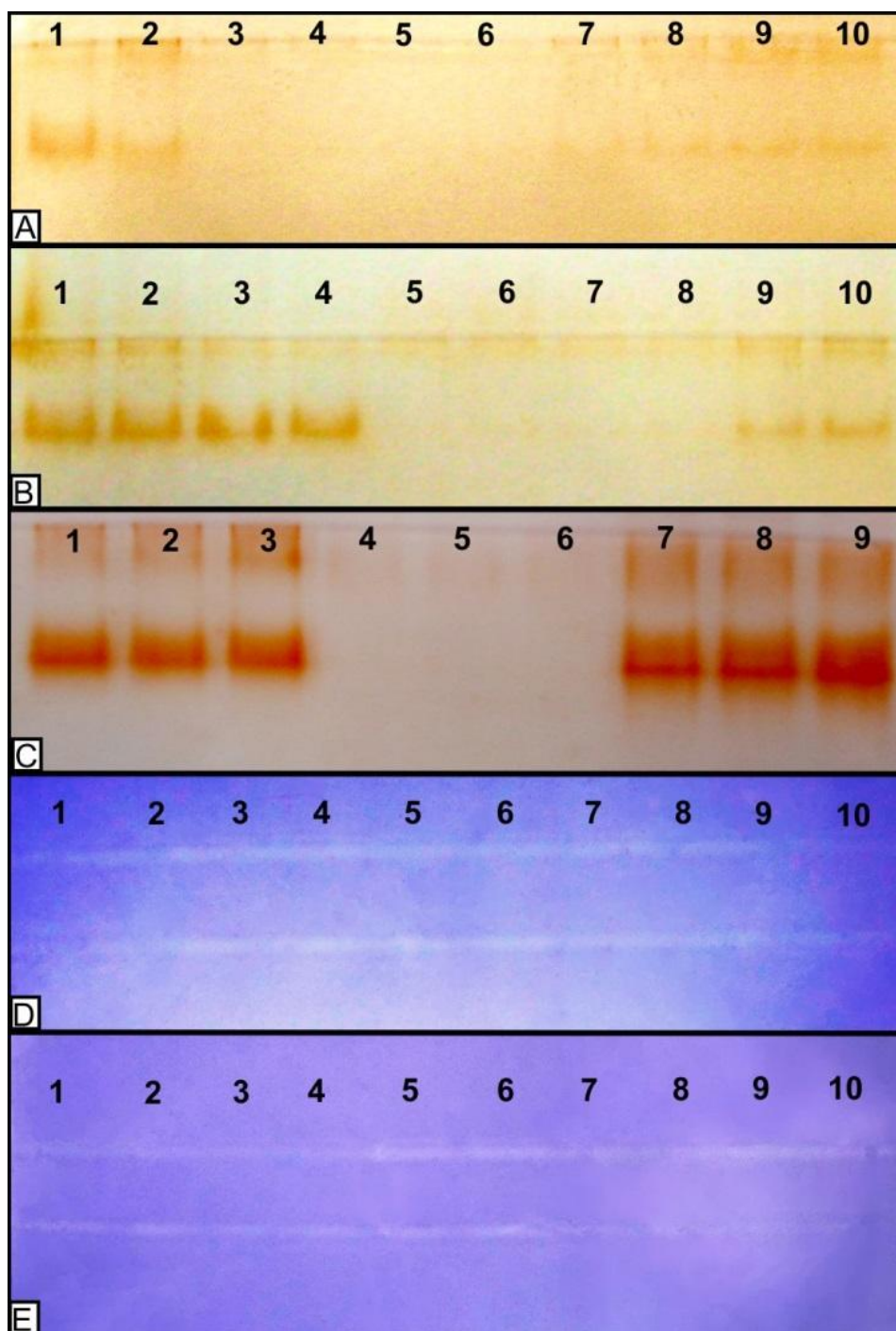
### **Perfis eletroforéticos**

A peroxidase (POD) é codificada por uma família multigênica, apresentando formas múltiplas entre espécies e cultivares e em resposta à idade fisiológica, parte da planta, tipo de tecido e compartimento celular (Scandalios, 1974; Amiot *et al.*, 1995).

A eletroforese do extrato enzimático da POD mostrou, no indivíduo 1 de *Billbergia horrida*, a presença de uma isoforma bastante evidente na porção apical da folha (poços 1 e 2), confirmando a elevada atividade enzimática encontrada nessa porção nas análises espectrofotométricas. Para a porção mediana (poços 3 e 4) e para a basal (poços 5 e 6) da folha, não foi detectada atividade enzimática da POD, resultado que se explica, em certo grau, pela baixa atividade observada para esta enzima nos ensaios de espectrofotometria (Fig. 2A).

No indivíduo 2, a amostra correspondente a região apical da folha (poços 7 e 8) apresentou apenas uma isoforma fracamente visível da POD (Fig. 2A). Para a porção mediana da folha (poços 9 e 10), foi observada a presença de uma banda de intensidade intermediária, ligeiramente mais forte do que a apresentada pela amostra procedente da porção apical da folha. Os poços 1 e 2, do gel B, correspondem a amostras procedentes da região basal do indivíduo 2, em que foram observadas bandas de intensidade forte, coincidindo com a atividade enzimática mais elevada encontrada nos ensaios de espectrofotometria para essa região da folha (Fig. 2B).

A porção apical da folha do indivíduo 3, correspondente aos poços 3 e 4, gerou bandas muito evidentes, confirmando a atividade enzimática mais elevada observada nos estudos de espectrofotometria com materiais dessa região da folha. Para as amostras referentes à região mediana (poços 5 e 6), não foi detectada atividade enzimática, com a ausência de bandas no gel. Nos poços 7 e 8, correspondentes a amostra da porção basal da folha, foi observada a presença de uma isoforma de intensidade fraca (Fig. 2B).



**Figura 2.** Géis de poliacrilamida nativos das isoenzimas da POD e da SOD de extratos de folhas de três indivíduos de *Billbergia horrida* estabelecidos em condições naturais. **Gel A:** Indivíduo 1: poços 1 e 2 (porção apical) poços 3 e 4 (porção mediana); poços 5 e 6 (porção basal). Indivíduo 2: poços 7 e 8 (porção apical); poços 9 e 10 (porção mediana). **Gel B:** Indivíduo 2: poços 1 e 2 (região basal). Indivíduo 3: poços 3 e 4 (porção apical); poços 5 e 6 (porção mediana); poços 7 e 8 (porção basal); Indivíduos 1 e 3: poços 9 e 10, respectivamente (porção apical). **Gel C:** Indivíduo 1-Portea petropolitana: poços 1, 2 e 3 (região apical); Indivíduo 1- Tillandsia polystachia: poços 4, 5 e 6 (região apical); Indivíduo 1- Billbergia horrida: poços 7, 8 e 9 (porção apical). **Gel D:** Indivíduo 1: poços 1 e 2 (porção apical) poços 3 e 4 (porção mediana); poços 5 e 6 (porção basal). Indivíduo 2: poços 7 e 8 (porção apical); poços 9 e 10 (porção mediana). **Gel E:** Indivíduo 2: poços 1 e 2 (região basal). Indivíduo 3: poços 3 e 4 (porção apical); poços 5 e 6 (porção mediana); poços 7 e 8 (porção basal); Indivíduos 1 e 3: poços 9 e 10, respectivamente (porção apical).

Em estudo realizado com cultivares de alface, Flores (2010) observou diferenças nos padrões isoenzimáticos da POD entre as diferentes porções das folhas. Avaliando a organogênese *in vitro* de *Acanthophyllum sordidum*, Meratan *et al.* (2009) encontraram até cinco isoformas da POD em plântulas, raízes, calos e brotos. Por sua vez, Lee *et al.* (2009), trabalhando com trevo branco, observaram a presença de isoenzimas da POD somente nas folhas submetidas ao estresse hídrico, sendo as bandas ausentes no controle. Aghaleh *et al.* (2014), em estudo com duas espécies de *Salicornia* cultivadas *in vitro* e submetidas a salinidade, relataram a presença de duas isoformas da POD nos géis em ambas as espécies, encontrando expressão diferencial das isoformas em resposta à exposição à salinidade. Em estudo com macieira, Molassiotis *et al.* (2006) relataram aumento na atividade da POD em resposta à salinidade, sendo que até cinco isoformas foram expressas em explantes expostos ao estresse. Fazelli *et al.* (2007) analisaram os efeitos da seca em raízes de dois cultivares de gergelim e observaram a presença de bandas da POD similares em todos os níveis de seca. Em estudo com dois híbridos de álamo com tolerância diferencial ao ozônio, Bernardi *et al.* (2004) observaram até sete isoformas da POD em folhas maduras não expostas ao ozônio, enquanto em folhas jovens, somente uma isoforma foi detectada.

Estudos também têm mostrado a ocorrência de diferentes padrões nas atividades de enzimas antioxidativas durante a senescência. Um aumento na geração de EROs devido ao envelhecimento pode ser responsável por essas diferenças (Bestwick *et al.*, 1997). Segundo Bernardi *et al.* (2004), padrões diferenciais de atividade das isoenzimas da SOD, POD e CAT ocorrem em resposta ao genótipo, ao desenvolvimento foliar e à exposição ao ozônio em híbridos de álamo. Diferenças significativas também foram observadas entre as folhas jovens e as maduras quanto às isoformas das referidas enzimas. A hipótese de que o envelhecimento resulta de uma acumulação de radicais livres nocivos é amplamente aceita (Harmam, 1981). As EROs são acumuladas de forma progressiva em resposta ao envelhecimento, sendo o cloroplasto a organela mais importante (Foyer & Noctor 2000). O fato de termos encontrado maior intensidade nas isoformas da POD na porção apical das folhas possivelmente decorre dessa região ser fisiologicamente mais madura da folha e fotossinteticamente mais ativa, uma vez que os ápices foliares correspondem ao sítio de assimilação fotossintética das bromélias (Freschi *et al.*, 2010), processo fisiológico associado à produção de EROs. Na análise espectrofotométrica nós também encontramos maior atividade dessa enzima na região apical da folha. Essas evidências reforçam a hipótese de as respostas estarem relacionadas ao processo natural de senescência foliar, o qual sempre é mais precoce na região apical da folha. As PODs também estão associadas aos processos de biossíntese de parede celular e lignina (Van Huystee, 1987), sendo a atividade enzimática regulada pelo desenvolvimento, tal como reportado por Bernardi *et al.* (2004), em estudo com híbridos de álamo.



No gel C são apresentados os perfis isoenzimáticos das POD de três espécies de bromélias estudadas no presente trabalho, sendo que, nos poços 1, 2 e 3, foram aplicados extratos enzimáticos de *Portea petropolitana*, para a qual foi observada a presença de duas isoformas bem visíveis, sendo uma, de menor intensidade e a outra, de forte intensidade. Nos poços 4, 5 e 6 foram aplicadas amostras de *Tillandsia polystachia*, para a qual não foi detectada atividade enzimática da POD. Nos poços 7, 8 e 9 foram aplicadas amostras de *Billbergia horrida*, sendo observadas duas isoformas bem visíveis da POD, sendo uma, de menor intensidade e outra de forte intensidade (Fig. 2C). A variação entre as espécies com relação à intensidade das bandas pode estar associada a diferenças em relação aos locos envolvidos e ao conteúdo de substratos disponíveis nas diferentes partes da folha. Menores intensidades das bandas das isoenzimas da POD foram detectadas sempre na porção mediana das folhas nos indivíduos das três espécies, sendo as maiores intensidades das bandas observadas nas porções apicais das folhas dos indivíduos 1 e 3 e, em contraste, na região basal do indivíduo 2 (Fig. 2C).

A eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante do extrato enzimático da SOD resultou no aparecimento de duas isoformas em todas as amostras dos três indivíduos avaliados, não diferindo os perfis isoenzimáticos nas diferentes regiões da folha. Os perfis isoenzimáticos dos três indivíduos estudados foram similares, exibindo duas isoformas comuns a todas as porções da folha (Fig. 2D-E). Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisas com *Portea petropolitana*, a expressão diferencial das isoenzimas de SOD entre indivíduos também foi observada (dados não publicados). A variabilidade isoenzimática tem sido associada ao tipo de tecido e à idade de desenvolvimento, observando-se variações no número ou nível de expressão em resposta à espécie e ao cultivar (Scandalios, 1974; Carpin *et al.*, 1999; Lepedus *et al.*, 2005; Rudrapa *et al.*, 2005; Hilaire *et al.*, 2008).

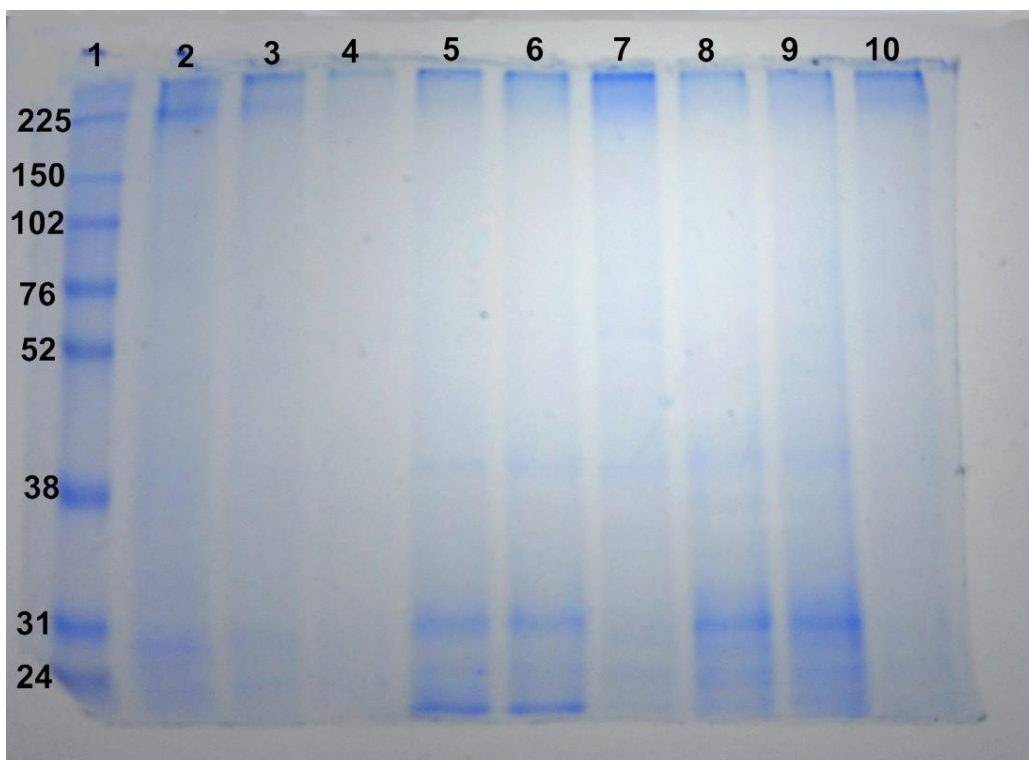
Em estudo relacionado à organogênese *in vitro* de *Acanthophyllum sordidum*, Meratan *et al.* (2009) encontraram até seis isoformas da SOD em plântulas, raízes, calos e brotos. Por sua vez, Lee *et al.* (2009), trabalhando com trevo branco, observaram a presença de apenas duas isoenzimas da SOD, cuja intensidade mostrou-se mais intensa quando a planta foi submetida ao déficit hídrico. Trabalhando com genótipos de feijão-guandu submetidos ao alagamento, Kumutha *et al.* (2009) encontraram cinco isoformas da SOD, sendo estas mais expressas em condições alagadas no genótipo mais tolerante. Em estudo com dois híbridos de álamo com tolerância diferencial ao ozônio, Bernardi *et al.* (2004) detectaram quatro isoformas da SOD, embora as variações entre as bandas tenham sido apenas quantitativas. Aghaleh *et al.* (2014), em estudo com duas espécies de *Salicornia* cultivadas *in vitro* e submetidas à salinidade, relataram a presença de seis isoformas da SOD nos géis em ambas as espécies, cuja atividade total foi gradualmente aumentada em resposta

ao estresse salino. O aumento da atividade da SOD em resposta à salinidade também foi reportado por Molassiotis *et al.* (2006) em estudo com macieira. Fazelli *et al.* (2007) analisaram os efeitos da seca em raízes de dois cultivares de gergelim, observando a presença das mesmas bandas da SOD nos dois cultivares, embora com diferentes intensidades.

As amostras apresentaram diferentes conteúdos de proteínas nas diferentes porções das folhas. Provavelmente, a maior fração da proteína solúvel total (Tab. 6) foi constituída pelas enzimas com maior atividade enzimática detectada nos géis. Todavia, tal como observado no ensaio espectrofotométrico, nenhuma isoforma da catalase (CAT) foi detectada na eletroforese realizada, independentemente do indivíduo e da posição na folha.

### **Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida quando conduzida com a proteína na forma desnaturada pela ação do dodecil sulfato de sódio, é denominada SDS-PAGE (Sgarbieri, 1996). O padrão de peso molecular aplicado no poço 1 do gel possuía oito bandas, cujos pesos moleculares variaram de 225 a 24 kDa (Fig. 3). Os poços 2, 3 e 4 apresentam os perfis de proteínas respectivamente das regiões apical, mediana e basal de folhas do indivíduo do primeiro ponto de coleta. No poço 2, correspondente à região apical da folha, foi observada uma banda próxima à 225 kDa e uma banda de intensidade fraca entre 31 e 24 kDa. No poço 3, correspondente à região mediana da folha, também foi observada a presença de uma banda próxima à 225 kDa, porém com menor intensidade. No poço 4, onde foi aplicada amostra da região basal, não foi observada nenhuma banda. Nos poços 5, 6 e 7 foram aplicadas amostras extraídas respectivamente das regiões apical, mediana e basal de folhas do segundo ponto de coleta. Nos poços 5 e 6, correspondentes às regiões apical e mediana da folha, foi observado o mesmo perfil, com a visualização de uma banda próxima à 31 kDa, outra com menor intensidade, próxima à 24 kDa, e uma inferior, com aproximadamente 24 kDa. No poço 7, correspondente à região basal da folha, não foi observada nenhuma banda. Nos poços 8, 9 e 10, correspondentes ao terceiro ponto de coleta, foi observada a mesma tendência do segundo ponto, sendo que os poços 8 e 9 apresentaram uma banda mais intensa próxima a 31 kDa. Uma banda próxima a 38 kDa, com intensidade fraca, ocorreu desde o poço 5 até o poço 9. No poço 10, correspondente à região basal, nenhuma banda foi visível. Nos três pontos de coleta o menor número de bandas foi visualizado para amostras extraídas da região basal, corroborando, adicionalmente, os resultados obtidos pela análise de quantificação de proteínas totais.



**Figura 3:** Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos de folhas de três indivíduos de *Billbergia horrida* estabelecidos em condições naturais. O poço 1 corresponde ao marcador de peso molecular. Poços 2, 3 e 4 correspondem à região apical, mediana e basal de folhas do indivíduo 1. Poços 5, 6 e 7 correspondem à região apical, mediana e basal de folhas do indivíduo 2. Poços 8, 9 e 10 correspondem à região apical, mediana e basal de folhas do indivíduo 3.

### CONCLUSÕES:

Os resultados encontrados no presente estudo possibilitaram o desenvolvimento de um protocolo eficiente de multiplicação para *Billbergia horrida*. As culturas foram estabelecidas *in vitro* a partir de sementes. As maiores taxas de multiplicação *in vitro* de *B. horrida* foram obtidas em meio de cultura suplementado com BAP, na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ . Explantes enraizados foram obtidos em resposta ao  $\text{GA}_3$ , na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ . Após três meses de cultivo *in vitro* as plantas foram eficientemente aclimatizadas, evidenciando que a micropropagação é uma ferramenta eficiente para a conservação e propagação em larga escala de *B. horrida*, uma espécie endêmica da Mata Atlântica. Padrões isoenzimáticos da SOD foram similares em todas as regiões avaliadas das folhas. Para as PODs foram observados diferentes padrões de intensidade de expressão da isoenzima nas diferentes posições das folhas. Os resultados encontrados sugerem que a maior intensidade da isoforma de POD na porção apical das folhas ocorre em função de essa região ser fisiologicamente mais madura, o que foi reforçado pela maior atividade espectrofotométrica observada nos extratos enzimáticos brutos nessa porção da folha. Essas respostas parecem estar relacionadas à maior maturidade dos tecidos na região apical das folhas, o que pode estar associado à biossíntese de parede celular e lignina durante o processo natural de

senescência foliar, que ocorre mais precocemente nessa região da folha. Relatos na literatura da ocorrência de atividade diferencial de enzimas antioxidativas em porções específicas de folhas de espécies de Bromeliaceae estão sendo apresentados pela primeira vez neste trabalho.

**Agradecimentos-** Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Apoio à Publicação da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-PROPESQ) pelo apoio financeiro. Também somos gratos ao Dr. Acelino Couto Alfenas e a Renildo de Oliveira, respectivamente, chefe e técnico de Laboratório de Patologia Molecular Florestal, Bioagro-UFV, pela importante contribuição nas análises de eletroforese. Agradecemos também aos responsáveis pelos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas do Bioagro (UFV) e Estrutura e Função de Proteínas, do Departamento de Bioquímica (UFJF).

## REFERÊNCIAS

- Aghaleh M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Razavi K (2014) Antioxidative enzymes in two *in vitro* cultured *Salicornia* species in response to increasing salinity. *Biol Plantarum* 58: 391-394
- Alcantara GB, Machado MP, Ribeiro DS, Wippel HH, Filho JCB, Oliveira RA, DAROS E (2014) Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações *in vitro* de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. *J Biotec Biodivers* 5: 20-25
- Alfenas AC (2006) Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. Ed. UFV, Viçosa
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53: 1331-1441
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol* 109: 1247-1257
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, pp 227–287
- Barboza MR, Silva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara TR (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, 44: 453-460
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287

- Benzing, DH (1990) Vascular epiphytes. Cambridge University Press, Cambridge. 354p
- Benzing, DH (2000) Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge. 690p
- Bernardi R, Nali C, Ginestri P, Pugliesi C, Lorenzini G, Durante M (2004) Antioxidant enzyme isoforms on gels in two poplar clones differing in sensitivity after exposure to ozone. *Biol Plantarum* 48:41-48
- Bestiwick CS, Brown IR, Benneth MHR, Mansfield JW (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9:209–22
- Bhattacharjee S (2010) Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers p.1-30
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:48-54
- Burnette FS (1977) Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *Journal of Food Science*. 42: 1-6
- Carpin S, Crèvecoeur M, Greppin H, Penel C (1999) Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol* 120: 799–819
- Carvalho GR, Pasqual M, Guimarães RJ, Mendes ANG, Antunes LEC, Silva AT (1998) Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento in vitro de embriões do cafeeiro cv. Acaia. *Pesqui Agropecu Bras* 33: 847-851
- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Method Enzymol* 2: 764-775
- Dal Vesco LL, Guerra MP (2010) *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. *Scientia Horticulturae* 125: 748-755
- Davis BJ (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci USA* 121: 404-427
- Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 34: 1023-1028
- Diniz JDN, Almeida JC, Teixeira ALA, Gomes ES, Hernandez FFF (2003) Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no crescimento in vitro de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. *Ciênc Agrotec* 27: 934-938
- Du, XM (2001) Production and scavenging of reactive species in plants. *Chinese Journal Biotechnology* 17: 121-125

- Easwar Rao D, Chaitanya KV (2015) Varietal Differences in the Antioxidative Properties of Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] Seeds J Food Biochemistry 39: 398-408
- Fazelli F, Ghorbanli M, Niknam V (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. Biol Plantarum 51: 98-103
- Flores MEP (2010) Alocação de matéria fresca, escurecimento enzimático e processamento mínimo de alface. Tese de Doutorado UFV, Viçosa
- Forzza RC (2005) Revisão taxonômica de (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). Bol Bot Univ São Paulo 23: 1-49
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B (2014) Bromeliaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6309> acesso em 07/03/2016
- Forzza RC, Wanderley MGL (1998) Pitcairnioideae (Bromeliaceae) na Serra do Cipó, MG, Brasil. Bol Bot Univ São Paulo 17: 255-270
- Foyer CH, Fletcher JM (2001) Plant antioxidants: colour me healthy. Biologist 48: 115-120
- Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: a molecular approach. - New Phytol 146: 359-392
- Freschi L, Rodrigues MA, Domingues DS, Purgatto E, Van Sylus MA, Magalhães JR, (2010) Nitric oxide mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. J Plant Physiol 4: 1971-1985
- Gomes, FP (1982) Curso de Estatística Experimental. 10ª edição. São Paulo: Nobel. 430p
- Gratão PL, Polle ALPJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Funct Plant Biol 32: 481-494
- Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Eds.) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, Brasília, 1: 233-237
- Harman, D (1981) The aging process. Proc Nat Acad Sci USA 78: 7124-7128
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiol 84: 450-455
- Hilaire KT, Ahipo DE, Eugene JPKN, Niamké S, Justin KY, Mérillon JM (2008) Purification and characterization of cell suspensions peroxidase from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Applied Biochemistry and Biotechnology 157: 575-592
- Jacques-Félix H (2000) The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. Selbyana 21: 118-124

- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57: 315-319
- Karuppanapandian T (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci* 5: 709-725
- Kibinza S, Bazin J, Bailly C, Farrant JM, Corbineau F, El-Maarouf-Bouteau, H (2011) Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science*, 181: 309-315
- Kochiba J, Button J, Spiegel-Roy P, Bornman CH, Kochiba M (1974) Stimulation of rooting of citrus embryoides by gibberellic acid and adenine sulphate. *Ann Bot* 38: 795-802
- Kumutha D, Ezhilmathi, K, Sairam, RK, Srivastava GC, Deshmukh PS, MEENA RC (2009) Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. *Biol Plantarum*, 53: 75-84
- Laemmli UK, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lee BR, Li LS, Jung WJ, Jin YL, Avicé JC, Ourry A, Kim TH (2009) Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. *Biol Plantarum* 53: 505-510
- Lepedus H, Gaça V, Cesar V (2005) Guaiacol peroxidases and photosynthetic pigments during maturation of spruce needles. *Croat Chem Acta* 78: 355-360
- Lewis NG, Yamamoto E (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496
- Lima TT (2008) Bromeliaceae da Serra da Mantiqueira. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, Universidade de São Paulo, São Paulo, 357p
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Macedo CEC, Silva MG, Nobrega FS, Martins PM, Barroso PAV, Alloufa MAI (2003) Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas in vitro. *Rev Bras Frut* 25: 501-504
- Magalhães JCAJ (1979) Calagem e adubação para trigo na região do cerrado. *Informe Agropecuário* 50: 23-28
- Malone G, Zimmer PD, Meneghello GE, Castro MAS, Peske ST (2007) Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de Germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. *Rev Bras de Sem* 29: 61-67

- Manfio CE, Motoike, YS, Paula, CCC, Valente MS, Melo CG (2010) Seleção precoce *in vitro* de clones elite de uma bromélia ornamental. *Ciência Rural* 40: 1537-1544
- Market C, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 45: 753-763
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59: 209-258
- Martinelli G, Vieira CM, Leitman P, Costa, AF, Forzza RC (2009) In: Stehmann JR, Forzza RC, Sobral M, Salino A, Kamino LHY (eds.) *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 516p
- Medina E, Ziegler H, Lüttge U, Trimborn P, Francisco M (1994) Light conditions during growth as revealed by  $^{13}C$  values of leaves of primitive cultivars of *Ananas comosus*, an obligate CAM species. *Funct Ecol* 8: 298–305
- Mendes GC, Soares CQG, Braga VF, Pinto LC, Santana R, Viccini LF, Peixoto PHP (2007) Multiplicação *in vitro* de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Rev Bras de Bioc* 5: 972-974
- Meratan A, Ghaffari SM, Niknam V (2009) *In vitro* organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. *Biol Plantarum* 53: 5-10
- Mercier H, Nievola CC (2003) Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1: 57-62
- Mioto PT, Mercier, H (2013) Abscisic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-regulated by drought. *Journal of Plant Physiology* 170: 996-1002
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-409
- Molassiotis AN, Sotiropoulos T, Tanou G, Kofidis G, Diamantidis G, Therios I (2006) Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biol Plantarum* 50: 61-68
- Moller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Phys* 52: 561-591
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Myers N, Mittermeier RA, Yers N, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858



- Panda SK, Khan MH (2009) Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. *Journal of Agronomy and Crop Science* 195: 442–454
- Pasqual M, Ribeiro VG, Ramos JD (1990) Influência do GA<sub>3</sub> e do carvão ativado sobre o enraizamento in vitro de embriões de laranja Natal. *Pesqui Agropecu Bras* 25: 1477-1482
- Pasqual M, Santos FC, Figueiredo MA, Junqueira MA, Rezende JC, Ferreira EA (2008) Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. *Hortic Bras* 26: 45-49
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidase have more functions than as Swiss army knife. *Plant Cell Rep* 24: 255-265
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'Anna, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzyme of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg* 11: 137-143
- Pereira PN, Purgatto E, Mercier H (2013) Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology* 170: 1067-1074
- Pilatti FK, Aguiar T, Simões T, Benson EE, Viana AM (2011) *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47: 82-98
- Popp M, Janett HP, Lüttge U, Medina E (2003) Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytol* 157: 649–56
- Ramirez H, Calderon A, Rocca W (1991) Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: Rocca, W, Mroginski L Eds., *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*, CIAT, Cali, 825-856
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161: 1189-1202
- Rhagavan V, Torrey JG (1964) Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capseila* in culture. *Plant Physiol* 39: 691-99
- Rudrappa T, Lakhmanan V, Kaunain R, Singara NM, Neelwarne B (2005) Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chem* 105 (3): 1312–1320
- Scandalios JG (1974): Subcellular localization of catalase variants coded by two genetic loci during maize development. *J Hered* 65: 28-32
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 101:7-12
- Sgarbieri VC (1996) Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações. São Paulo: Varela, 517p

- Silva ALL, Franco ETH, Dornelles EB, Reichert BCL, Quoirin M (2009) *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E, Morrem (Bromeliaceae). *Iheringia Sér Bot* 64: 151-156
- Simova-Stoilova L, Demirevska K., Petrova T, Tsenov N, Feller U (2008) Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil Environ* 54: 529-536
- Smith LB, Downs R J (1974) Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, Hafner Press 14: 1-658
- Soares JDR, Araujo AG, Pasqual M, Rodrigues FA, Assis FA (2009) Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento in vitro de plântulas de orquídea. *Ciência Rural* 39: 772-777
- Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY (2009) *Plantas da Floresta Atlântica*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brazil
- Taiz L, Zeiger E (2013) *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 954 p
- Takahashi CA, Ceccantini GCT, Mercier H (2007) Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Braz J Plant Physiol* 19: 119-126
- Takahashi CA, Mercier H (2011) Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *J Plant Physiol* 168: 1208-1216
- The Plant List (2013) Version 1.1. Published on the internet. Available in <http://www.theplantlist.org/>.(access in 08/05/2016)
- Uarrota VG, Moresco R, Schmidt EC, Bouzon ZL, Nunes EC, Neubert EO, Peruch LAM, Rocha M, Maraschin M (2016) The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry* 197: 737-746
- Van Huystee RB (1987) Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annu Rev Plant Phys* 38: 207-219
- Veljoviû -Jovanoviû S (1998) Active oxygen species and photo-synthesis: Mehler and ascorbate peroxidase reactions. *Acta Physiol Pharmacol* 34: 503-522
- Versieux LM, Wendt T (2007) Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais State, Brazil. *Biodivers Conserv* 16: 2989-3009
- Wang WX, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA (1971) Improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44: 301-305

- Zheng YX, Wu, JC, Cao FL, Zhang YP (2010) Effects of water stress on photosynthetic activity, dry mass partitioning and some associated metabolic changes in four provenances of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Photosynthetica* 48: 361-369
- Zotz G, Reichling P, Valladares F (2002) Assimilation study on the importance of size-related changes in leaf morphology and physiology for carbon gain in an epiphytic bromeliad. *Ann Bot* 90: 437-4

## 5. CAPÍTULO 3--- Artigo nas Normas da Acta Physiologia Plantarum:

### Propagação *in vitro* e análises enzimáticas em plantas de *Tillandsia polystachia* (L.)

Aline M. de O. Silva · Cristiano F. Resende · Vinícius P. Sacramento · Priscila F. Pinto · Cleberson Ribeiro · Acelino C. Alfenas · Paulo H. P. Peixoto

**Resumo-** A família Bromeliaceae apresenta distribuição essencialmente neotropical, compreendendo 52 gêneros e 3.320 espécies. O acelerado processo de destruição dos ecossistemas, somado ao extrativismo predatório, tem levado a reduções drásticas nas populações. A cultura de tecidos apresenta-se como uma opção bastante atrativa, propiciando taxas elevadas de multiplicação. A realização de pesquisas fisiológicas básicas com bromélias ainda é rara. O O<sub>2</sub>, inevitavelmente, conduz à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em eventos metabólicos normais como a fotossíntese e a respiração. Os sistemas de defesa que promovem a eliminação das EROs envolvem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. No sentido de promover a preservação *in vitro* de *Tillandsia polystachia* assim como a sua multiplicação em larga escala, este estudo teve por objetivos o estabelecimento de um protocolo de multiplicação *in vitro* de alta eficiência. Para tanto, diferentes citocininas e uma giberelina foram testadas visando à identificação do tratamento mais adequado. Foram realizados estudos das atividades enzimáticas brutas e dos perfis isoenzimáticos das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) em indivíduos desenvolvidos em diferentes estratos de altura de uma mangueira (forófito). O tratamento que promoveu a melhor taxa de propagação *in vitro* de *T. polystachia* foi o suplementado com BAP a 2,5 µM. Um maior número de raízes foi obtido em resposta a GA<sub>3</sub> a 10 µM. O mesmo padrão de isoenzimas da SOD foi observado nas diferentes alturas do forófito. A atividade da POD não foi detectada por eletroforese, embora tenha sido observada na análise espectrofotométrica, especialmente nas posições medianas e na mais elevada do forófito. Na análise espectrofotométrica, as CATs e as SODs mostraram atividades similares, sendo os valores mais elevados encontrados nas plantas estabelecidas nas posições mais baixas e mais altas do forófito. O teor de proteínas também seguiu esse mesmo padrão. Os resultados deste estudo mostraram, pela primeira vez, a variação na expressão de enzimas antioxidativas em folhas de plantas de bromélias desenvolvidas em diferentes alturas de um forófito.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática, biodiversidade, eletroforese, propagação *in vitro*.

**A. M. O. Silva · C. F. Resende · V. P. Sacramento · P. H. P. Peixoto** ✉ Plant Physiology Laboratory, Department of Botany, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Brazil; e-mail: paulo.peixoto@ufjf.edu.br; **P. F. Pinto**, Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Brazil; **Cleberon Ribeiro**, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, 36570-000 Viçosa, Brazil; **Acelino C. Alfnas**, Department of Plant Pathology, Federal University of Viçosa, 36570-000 Viçosa, Brazil

## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae possui distribuição essencialmente neotropical (Benzing, 2000), sendo tradicionalmente subdividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Smith & Downs, 1974; Cronquist, 1988). A família é composta por 52 gêneros que abrangem 3.320 espécies (The PlantList, 2013). Nos domínios da Mata Atlântica Bromeliaceae apresenta elevada riqueza, diversidade e endemismo, sendo a família que apresenta o mais alto número de espécies ameaçadas, condição que justifica sua inserção como prioridade em programas de conservação da biodiversidade (Pilatti *et al.*, 2011). A Mata Atlântica é uma das 35 áreas listadas como *hotspots* mundiais para conservação da vida selvagem (Myers, 2000; Zachos & Habel, 2011). No entanto, restam apenas 11,73% da sua área original (Ribeiro *et al.*, 2009).

O gênero *Tillandsia* ocorre em todos os ecossistemas (Martinelli, 2008) e, apesar da alta riqueza específica encontrada no Brasil (53 espécies), estudos envolvendo suas espécies são escassos. *Tillandsia polystachia* apresenta ampla distribuição geográfica ocorrendo nos Estados Unidos, México, Caribe, Colômbia, Equador, Venezuela e no Brasil, especialmente nos estados do nordeste (PB, PE, AL, BA) no sudeste (MG, ES, RJ) e no sul (PR). A espécie caracteriza-se por apresentar inflorescências com brácteas verdes, flores com corola atrativa lilás e estames exsertos, em função da coloração de suas brácteas e flores, *T. polystachia* tem alto valor ornamental (Kremer, 2011).

Reduções drásticas das populações e consequente perda de diversidade tem ocorrido devido ao acelerado processo de destruição dos ecossistemas e ao extrativismo predatório (Forzza, 1998; 2005). Em função disso, a cultura de tecidos apresenta-se como uma opção bastante atrativa, uma vez que possibilita a obtenção de taxas elevadas de multiplicação a partir de diferentes explantes, revertendo os riscos de extinção (Mercier & Nievola, 2003). A cultura de tecidos é uma ferramenta importante para a conservação genética das espécies, possibilitando o uso sustentável das plantas (Soares *et al.*, 2009).

A realização de pesquisas fisiológicas básicas com bromélias ainda é rara (Nievola *et al.*, 2005). Embora necessário para o desempenho normal das funções celulares, o O<sub>2</sub> conduz inevitavelmente à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em eventos metabólicos essenciais como a fotossíntese e a respiração (Mittler *et al.*, 2002; Bhattacharjee, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011; Uarrota *et al.*, 2016). Os centros de reação dos PSI e PSII nos tilacóides são locais de intensa geração de EROs (Asada, 2006), formadas como resultado da redução parcial do O<sub>2</sub> atmosférico (Ren *et al.*, 2016). As EROs são subprodutos do metabolismo aeróbico nas plantas (Asada *et al.*, 1987; Gratão *et al.*, 2005; Moller, 2001), embora quando se acumulam nos tecidos vegetais em níveis tóxicos possam levar as células à morte (Mittler, 2002). Os sistemas de defesa que promovem a eliminação das EROs envolvem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Kibinza *et al.*, 2011; Mittler, 2002; Scandalios, 1993). Dentre as enzimas que participam dos principais mecanismos de tolerância contra os estresses oxidativos nas plantas destacam-se as catalases (CATs), as superóxido dismutases (SODs) e as peroxidases (PODs) (Scandalios, 1993; Mittler, 2002; Zheng *et al.*, 2010). A SOD promove a transmutação dos radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) à peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sendo considerada uma enzima antioxidativa de primeira linha de defesa para eliminação das EROs (Alscher *et al.*, 2002). As enzimas CAT e POD finalizam o processo, transformando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água (Mittler, 2002). Desde que os polimorfismos genéticos para isoenzimas foram descobertos (Stebbins, 1989), eles têm sido utilizados como marcadores bioquímicos para estudar o desenvolvimento, diferenciação e respostas das plantas aos estresses. O polimorfismo isoenzimático depende também do estágio de desenvolvimento e metabólico da planta, da senescência, bem como da duração e intensidade dos estresses (Bray, 1997; Procházková e Wilhelmová, 2007; Reddy *et al.*, 2004; Simova-Stoilova *et al.*, 2008). As EROs também se acumulam progressivamente em resposta ao envelhecimento (Foyer & Noctor 2000).

No sentido de promover a preservação *in vitro* de *Tillandsia polystachia* assim como a multiplicação em larga escala, este estudo teve como objetivos desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* e aclimatização *ex vitro* dessa espécie. Este estudo também avaliou as respostas dos sistemas enzimáticos das SOD, CAT e POD em indivíduos estabelecidos em diferentes alturas de um forófito, tanto por espectrofotometria quanto por eletroforese.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Propagação *in vitro***

Cápsulas contendo sementes de *Tillandsia polystachia* (L.) foram coletadas em indivíduos estabelecidos naturalmente em um forófito (*Mangifera indica* L.) no Jardim Botânico da UFJF

(Universidade Federal de Juiz de Fora). Após a toailete, as cápsulas foram lavadas em água corrente na presença de gotas de detergente neutro. Em seguida, o material foi transferido para béqueres contendo hipoclorito de sódio a 0,3% (v/v) adicionado de duas gotas de Tween-20, durante 20 minutos, em câmara de fluxo laminar. Após esse procedimento, as cápsulas foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, o material foi dissecado para a obtenção das sementes, sendo estas inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de Knudson na ½ força dos sais, acrescido de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a 5 µM. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem, realizada à 120 °C, por 20 minutos. O material, após a inoculação em câmara de fluxo laminar, foi mantido em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (26°C ± 1°C), fotoperíodo (16-8 h) e luminosidade (40 µmoles de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Os tubos de ensaio foram observados semanalmente visando detectar o aparecimento de contaminações microbiológicas, além da ocorrência de oxidação fenólica.

Após o estabelecimento e estabilização *in vitro* das culturas de *Tillandsia polystachia*, teve início a fase de multiplicação, empregando-se o meio de Knudson adicionado dos reguladores de crescimento BAP, CIN, GA<sub>3</sub> e TDZ, todos a 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µM. Após 90 dias, foi realizada a avaliação do experimento, sendo considerados os parâmetros: número de brotações, brotações maiores que dois cm, altura das brotações, número de raízes e presença de calos, uma análise qualitativa foi realizada adicionalmente, sendo que três avaliadores independentes atribuíram notas que variaram de 1 a 5 aos explantes representativos de cada tratamento avaliado.

As plantas enraizadas e com partes aéreas desenvolvidas foram transferidas para bandejas de poliestireno expandido de 120 células (120 mL/célula), preenchidas com substrato comercial Plantmax Hortaliças HT® (Eucatex) umedecido e cobertas com lâmina plástica transparente, sendo mantidas sob sombreamento e irrigação periódica em condições controladas. Após 35 dias de aclimatização, os materiais foram transferidos para casa de vegetação, com sistema automatizado de nebulização por micro-aspersão, sob plástico e sombrite® 75%, onde permaneceram por 180 dias, até a completa aclimatização das plantas.

Os dados obtidos nas diferentes etapas da micropropagação foram submetidos à análise de variância, sendo as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Gomes, 1982). As análises foram realizadas utilizando-se o programa SAEG, versão 9.1.

### **Atividade das enzimas antioxidantes**

Os extratos brutos para as determinações das atividades das catalases (CATs), das peroxidases (PODs) e das superóxido dismutases (SODs) foram obtidos pela maceração em N<sub>2</sub> líquido de 0,3 g de tecidos foliares a partir de amostras coletadas em três indivíduos de *Tillandsia*

*polystachia* estabelecidos naturalmente em três estratos (1 - inferior = 3 m de altura; 2 - mediano = 6 m de altura; 3 - superior = 9 m de altura) de um forófito (*Mangifera indica* L.), desenvolvido em condições naturais no Jardim Botânico da UFJF. As amostras foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, na presença de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e PVPP 1% (p/v) segundo Peixoto *et al.* (1999), sendo centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos, a 4°C.

A atividade das CATs foi determinada após a adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30°C (Havir e McHale, 1987). O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado considerando a redução na absorvância a 240 nanômetros (nm) utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Anderson *et al.*, 1995). A atividade das PODs foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976) a partir de alíquotas de 50 µL do extrato enzimático bruto adicionadas a 4,95 mL de tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, contendo pirogalol 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM. Após incubação por 1 minuto a 25°C, a reação foi interrompida pela adição 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% (v/v) e a absorvância foi lida a 420 nm. A atividade da POD foi determinada pela determinação da quantidade de purpurogalina formada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Chance & Maehley, 1955). A atividade das SODs foi determinada segundo 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, foram adicionados 50 µL do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25°C em câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada e, após 4 minutos, interrompida pelo desligamento da mesma (Giannopolitis & Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi estimada pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando BSA como padrão.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Gomes, 1982). As análises foram realizadas utilizando-se o programa SAEG, versão 9.1.



### **Eletroforese em Gel nativo:**

Para determinação dos perfis isoenzimáticos das amostras coletadas em folhas de três indivíduos de *Tillandsia polystachia* naturalmente estabelecidos em três estratos (inferior; mediano e superior) de um forófito (*Mangifera indica* L.) em condições naturais no Jardim Botânico da UFJF, foram realizadas eletroforeses em gel de poli(acrilamida nativo) (*native-PAGE*) constituídos de gel de separação 10% e gel de empilhamento 4%, segundo o método modificado de Davis (1964). A corrida foi realizada a 4°C, sem adição de SDS e mercaptoetanol empregando-se um minissistema de eletroforese vertical (Modelo Mini-Protean Tetra Cell; Bio-Rad®). A corrida foi realizada a 100 V enquanto o azul de bromofenol permaneceu no gel de empilhamento, sendo aumentada para 120 V assim que o corante alcançou o gel de separação. Nas eletroforeses foram utilizados os mesmos extratos empregados nas análises de espectrofotometria (Peixoto *et al.*, 1999). Para a caracterização das isoenzimas da superóxido-dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1), o gel foi incubado em tampão Tris HCl 0,5 M (pH 8,5), contendo 5 mg de riboflavina, 10 mg de brometo azul de tiazolil tetrazólio (MTT) e 150 mg de EDTA (Alfenas, 2006). Os géis foram agitados lentamente durante a exposição a uma lâmpada de 15 W em transiluminador até o aparecimento de bandas brancas em fundo violeta. As isoenzimas da peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foram caracterizadas pela incubação do gel após eletroforese em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), contendo 40 mg de orto-dianisidina e 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. Em seguida, o gel foi incubado em estufa a 37°C até o aparecimento de bandas alaranjadas (Alfenas, 2006). As isoenzimas da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foram caracterizadas pela incubação do gel em solução contendo 0,003% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por 25 min, e pelo posterior tratamento com solução contendo 1% (v/v) de FeCl<sub>3</sub> e 1% (v/v) de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, por 10 min, conforme descrito por Woodbury *et al.* (1971).

### **Eletroforese em Gel desnaturante:**

Para determinação dos perfis totais de proteínas das amostras nas diferentes posições das folhas foi realizada eletroforese em gel de poli(acrilamida a 10%) (SDS-PAGE) com 0,1% de dodecil sulfato de sódio de acordo com Laemmli (1970). Foram aplicados 60 µg de proteína por poço. As amostras foram solubilizadas, separadamente, em tampão de amostra. A corrida foi realizada em voltagem constante de 100 V durante duas horas. Os géis foram corados com *Coomassie brilliant blue G-250*. O marcador de peso molecular utilizado foi o Amersham ECL Full-Range Rainbow (GE), cuja amplitude de pesos moleculares varia de 12 a 225 kDa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação *in vitro* das sementes de *T. polystachia* iniciou-se 10 dias após a inoculação das mesmas, apresentando eficiência de 100% e ausência de contaminação microbiana, o que evidenciou uma elevada germinabilidade das sementes e uma alta eficácia dos procedimentos de desinfestação.

Em todas as concentrações avaliadas (2,5; 5; 7,5 e 10  $\mu\text{M}$ ), a adição de BAP, em concentrações crescentes, promoveu aumentos significativos no número de brotações (Tabela 1). Sob o ponto de vista dos custos de produção e visando a redução na ocorrência de hiperidricidade, a utilização da menor concentração desse regulador de crescimento é a mais indicada. Das citocininas comercialmente disponíveis, a BAP é a mais utilizada, uma vez que possui baixo custo e alta eficiência na promoção da multiplicação *in vitro* em diferentes espécies de bromélias (Mercier & Nievola, 2003; Pasqual *et al.*, 2008).

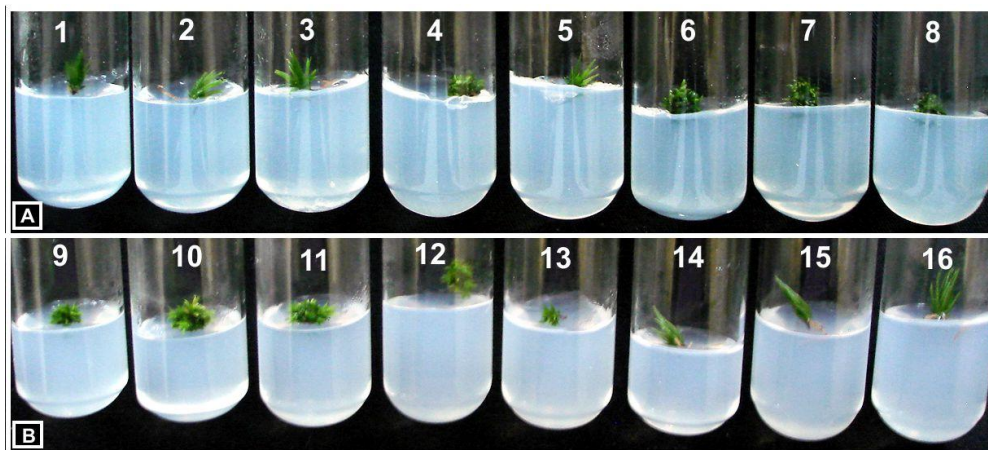
Em estudo com *Billbergia distachia*, Mendes *et al.* (2007) relataram incrementos significativos no número de brotações em resposta às concentrações de 10 e 15  $\mu\text{M}$ , doses mais elevadas do que as aplicadas no presente trabalho. A espécie *T. pollystachia* se destacou em função de sua resposta mais eficiente em termos propagação, ter sido observada na menor concentração de BAP. Todavia, as brotações obtidas em culturas de *T. pollystachia* foram muito menores que as obtidas para culturas de *Portea petropolitana* e de *Bilbergia horrida*. Nos tratamentos em que os demais reguladores de crescimento foram utilizados, o número de brotações foi ainda menor, o que reforça o potencial do BAP em promover a multiplicação *in vitro* de culturas de *T. pollystachia* (Tabela 1, Fig. 1). Em culturas de *V. scalaris*, Silva *et al.* (2009) observaram que o BAP foi mais eficaz do que a CIN na promoção da multiplicação *in vitro*, sendo 4,5  $\mu\text{M}$  a concentração de BAP que promoveu o maior número de brotações para a espécie, com 8 brotações/explante.

**Tabela 1.** Número total brotações em explantes de *Tillandsia polystachia* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	1,0 aB <sup>1</sup>	1,0 aB	1,0 bB	1,0 aB
2,5	1,0 aB	0,0 bC	9,85 aA	1,0 aB
5	1,0 aB	0,0bC	11,26 aA	1,0 aB
7,5	1,0 aB	0,0 bC	11,31 aA	1,0 aB
10	1,64 aB	0,0 bC	12,95 aA	1,0 aB

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na concentração de 10  $\mu\text{M}$  de CIN, 1,6 brotações foram obtidas, taxa de propagação razoável, embora muito inferior àquelas encontradas nos tratamentos suplementados com BAP. A adição de TDZ ao meio de cultura promoveu a formação de calos em todas as concentrações avaliadas (Tabela 1, Fig. 1). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o excesso de citocininas no meio de cultura pode causar fitotoxidez, que se caracteriza pelo excessivo entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e hiperidricidade generalizada.



**Figura 1.** Detalhes de plântulas de *T. polystachia* cultivadas *in vitro* em meios MS suplementados com KIN (1, 2, 3, 4 - **A**), de TDZ (5, 6, 7, 8, 9 - **A**), BAP (9, 10, 11, 12 - **B**) e  $\text{GA}_3$  (13, 14, 15, 16 - **B**), 90 dias após a inoculação. Todos os reguladores de crescimento foram adicionados, respectivamente, a 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0  $\mu\text{M}$

A suplementação do meio de cultura com  $\text{GA}_3$  também não resultou em incrementos expressivos no número de brotações para *T. polystachia*, de modo que as médias não diferiram entre si. Resultados semelhantes foram encontrados por Soares *et al.* (2009), trabalhando com híbrido de orquídea *Hadrolaelia lobatta* x *Hidrolaelia purpurata* Aço. Segundo Kochiba *et al.* (1974), o  $\text{GA}_3$  estimula o aparecimento e, ou o desenvolvimento de zonas meristemáticas já existente na raiz, permitindo a neogênese de raízes.

Para culturas de *T. polystachia*, os maiores números de raízes foram encontrados em resposta ao  $\text{GA}_3$ , especialmente à 10  $\mu\text{M}$ , com a formação de 3,0 raízes/explante (Tabela 2, Fig. 1). Esses resultados diferem daqueles obtidos por Alcântara *et al.* (2014), em estudo com cana-de-açúcar, e por Carvalho *et al.* (1998), trabalhando com culturas de *Coffea arabica*, esses autores relataram que o  $\text{GA}_3$ , em concentrações elevadas, afetou negativamente o processo de emergência das raízes. No entanto, outros autores afirmam que o  $\text{GA}_3$ , em concentrações elevadas, aumenta a taxa de enraizamento das culturas (Diniz *et al.*, 2003; Pasqual *et al.*, 1990). No presente trabalho, o aumento da concentração de  $\text{GA}_3$  proporcionou um incremento no número de raízes, segundo

Grattapaglia & Machado (1998), a resposta aos reguladores de crescimento é dependente da espécie e do sítio de absorção do hormônio.

**Tabela 2.** Número de raízes em explantes de *Tillandsia polystachia* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração (μM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	1,30 bC <sup>1</sup>	1,30 a	1,30 a	1,30 c
2,5	2,0 aB	0,0 bE	0,0 bE	1,30 cC
5	1,0 bC	0,0 bE	0,0 bE	1,16 cC
7,5	1,0 bC	0,0 bE	0,0 bE	2,0 bB
10	0,6 bD	0,0 bE	0,0 bE	3,0 aA

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na presença de TDZ e de BAP o desenvolvimento de raízes não foi observado. Macedo *et al.* (2003) também observaram inibição na formação de raízes em explantes de *Ananas comosus* cultivados em meio de cultura na presença de BAP. As citocininas podem ter uma ação inibitória sobre o enraizamento, por exibirem uma forte interação com outros hormônios, interferindo na atividade de auxinas e inibindo a divisão celular, necessária à fase de iniciação radicular (Grattapaglia & Machado, 1998). Os valores mais elevados de alongamento de raízes foram obtidos nos tratamentos suplementados com GA<sub>3</sub>, especialmente nas concentrações de 7,5 e 10 μM que produziram raízes com, respectivamente, 2,16 e 2,50 cm de comprimento (Tabela 3).

**Tabela 3.** Tamanho de raiz em explantes de *Tillandsia polystachia* obtidas *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração (μM)	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	1,16 aB <sup>1</sup>	1,16 a	1,16 a	1,16b
2,5	0,93 aB	0,0 bC	0,0 bC	1,0 bB
5	0,76 aB	0,0 bC	0,0 bC	1,16 bB
7,5	1,0 aB	0,0 bC	0,0 bC	2,16 aA
10	1,16 aB	0,0 bC	0,0 bC	2,5 aA

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na avaliação qualitativa realizada, o tratamento que obteve as melhores notas foi o suplementado com BAP a 10  $\mu\text{M}$  (Tabela 4), sendo esse tratamento, exatamente, o que apresentou o maior número de brotações/explante na análise quantitativa.

**Tabela 4.** Média das notas atribuídas a explantes de *Tillandsia polystachia* obtidos *in vitro* na presença de concentrações crescentes de CIN, TDZ, BAP e GA<sub>3</sub>, 90 dias após a inoculação.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	CIN	TDZ	BAP	GA <sub>3</sub>
0	3,0 aC <sup>1*</sup>	3,0 bC	3,0 cC	3,0 bC
2,5	3,16 aC	3,16bC	3,33 cC	3,33 bC
5	3,16 aC	3,33 bC	4,0 bB	3,33 bC
7,5	3,33 aC	4,0 aB	4,0 bB	3,83 aB
10	3,33 aC	3,33 bC	4,5 aA	3,5 aC

<sup>1</sup>Letras minúsculas comparam diferentes concentrações de cada regulador (nas colunas) e letras maiúsculas comparam todos os reguladores. Médias seguidas por mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \*(A nota 5 foi atribuída a explantes com melhor qualidade enquanto a nota 1 a explantes de baixa qualidade)

#### Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das catalases (CATs) não diferiu entre as amostras das plantas de *Tillandsia polystachia* desenvolvidas nos estratos inferior e superior do forófito. No entanto, plantas desenvolvidas na porção mediana não apresentaram atividade detectável dessa enzima (Tabela 5). As maiores atividades das peroxidases (PODs) foram encontradas nas plantas desenvolvidas nas porções mediana e superior do forófito, sem diferenças entre elas (Tabela 5). Para essa enzima, a atividade encontrada nas plantas desenvolvidas na porção inferior do forófito foi muito menor que nas demais. De modo semelhante ao observado para as CATs, para as superóxido dismutases (SODs), as maiores atividades enzimáticas foram encontradas nos indivíduos desenvolvidos nos estratos inferior e superior do forófito (Tabela 5). A SOD representa uma barreira enzimática contra os efeitos prejudiciais dos estresses oxidativos, convertendo o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Alsher *et al.*, 2002; Shafi *et al.*, 2015). Em paralelo, a CAT atua reduzindo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e liberando  $\text{O}_2$ , contribuindo para a redução da formação de outras EROs, especialmente do radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) através da reação Haber–Weiss (Kibinza *et al.*, 2011).

**Tabela 5.** Atividade de CAT [ $\text{mmol mg}^{-1}$  (prot.)  $\text{min}^{-1}$ ], POD [ $\text{nmol mg}^{-1}$  (prot.)  $\text{min}^{-1}$ ], SOD [ $\text{Umg}^{-1}$  (prot.)] e de proteínas totais [ $\text{mg g}^{-1}$  (f.m.)] em tecidos foliares de *Tillandsia polystachia*, provenientes de três estratos de um forófito.

Estrato	CAT	POD	SOD	PROT
Inferior	43,57 a <sup>1</sup>	2,78 b	139,32 a	0,303 a
Mediano	0,00 b	7,10 a	94,26 b	0,187 b
Superior	32,75 a	8,95 a	135,10 a	0,264 a

<sup>1</sup>As médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As CAT e SOD são as enzimas mais eficazes do metabolismo antioxidante, uma vez que as suas ações combinadas convertem moléculas perigosas em outras pouco reativas, evitando danos aos componentes celulares (Scandalios, 1993). As diferentes afinidades da CAT ( $\mu\text{M}$ ) e da POD ( $\text{mM}$ ) pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  sugerem que elas pertençam a duas diferentes classes de enzimas relacionadas à remoção da maior parte do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo a POD responsável pelo ajuste fino dos níveis dessas EROs produzidas em resposta aos estresses (Mittler, 2002). Em conformidade com essas especificidades enzimáticas, no presente estudo, foram detectadas maiores atividades das CATs do que das PODs, reforçando a atuação das CATs como enzimas chave na eliminação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em *T. polystachia* (Ghanati *et al.*, 2005).

Os conteúdos de proteínas encontrados nos tecidos das plantas desenvolvidas nos estratos inferior e superior do forófito não diferiram entre si, sendo, entretanto, mais elevados do que o observado no estrato mediano (Tabela 5). Em média, o conteúdo de proteínas nas plantas dos três estratos foi de  $0,251 \text{ mg g}^{-1}$  (f.m.), valor próximo ao conteúdo de proteínas encontrado por Resende *et al.* (2012) em estudo com plantas de *Pitcairnia encholirioides* cultivadas *in vitro*.

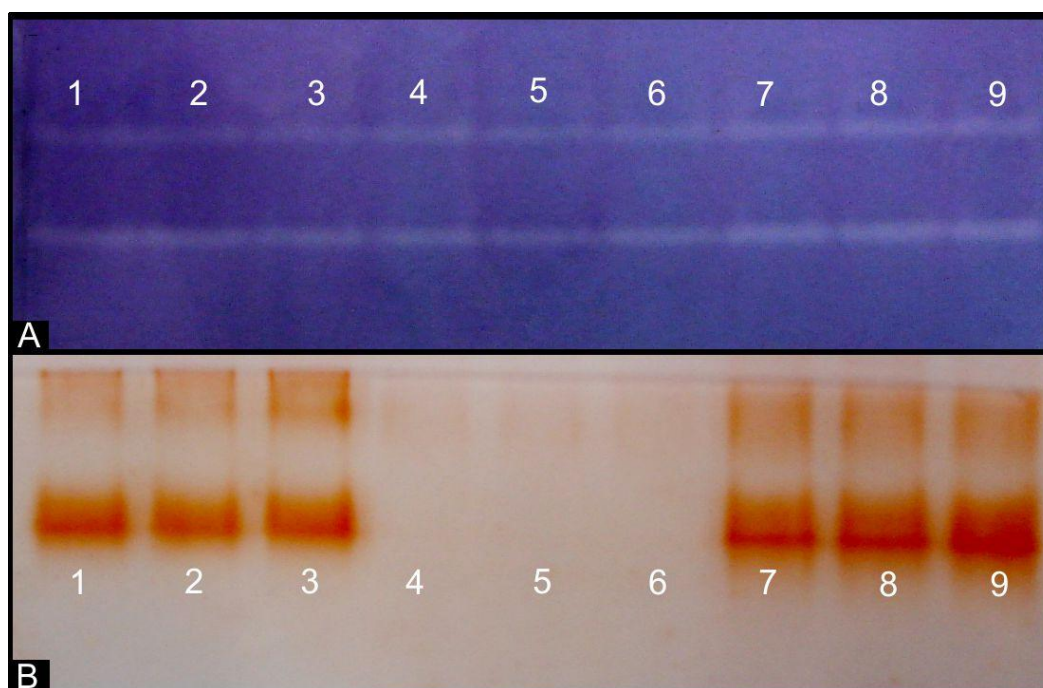
## Eletroforese

A eletroforese em PAGE não-desnaturante da SOD mostrou que os perfis isoenzimáticos dos indivíduos dos três estratos estudados foram similares, exibindo duas isoenzimas comuns às três alturas no forófito (Figura 2-A). Em estudo com *Portea petropolitana* (dados não publicados), padrões diferenciais de isoenzimas da SOD foram observados entre indivíduos localizados em diferentes pontos de coleta. A variabilidade isoenzimática tem sido associada ao tipo de tecido e à idade de desenvolvimento, relatando-se mudanças no número ou nível de expressão, dependendo da espécie, do cultivar e de condições ambientais (Scandalios, 1974; Carpin *et al.*, 1999; Lepedus *et*

*al.*, 2005; Rudrapa *et al.*, 2005; Hilaire *et al.*, 2008). As isoenzimas atuam na defesa contra estresses ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos (Pedó *et al.*, 2015).

Em estudo avaliando a organogênese *in vitro* de *Acanthophyllum sordidum*, Meratan *et al.* (2009) encontraram até seis isoformas diferentes da SOD em plântulas, raízes, calos e brotos. Por outro lado, Lee *et al.* (2009), trabalhando com trevo branco, observaram a presença de somente duas isoenzimas, cuja intensidade mostrou-se mais forte quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico. Trabalhando com genótipos de feijão-guandu submetidos ao alagamento, Kumutha *et al.* (2009) encontraram cinco isoformas da SOD, sendo elas mais expressas em condições de alagamento no genótipo mais tolerante. Em estudo com dois híbridos de álamo com tolerância diferencial ao ozônio, Bernardi *et al.* (2004) encontraram quatro isoformas da SOD após exposição ao ozônio. Aghaleh *et al.* (2014), em estudo com duas espécies de *Salicornia* cultivadas *in vitro* e submetidas à salinidade, relataram a presença de seis isoformas da SOD nos géis em ambas as espécies, sendo que a atividade total da enzima foi gradualmente aumentada pelo estresse salino. O aumento da atividade de SOD em resposta à salinidade também foi reportado por Molassiotis *et al.* (2006) em estudo com macieira, onde os autores observaram até três isoformas distintas da SOD. Fazelli *et al.* (2007) analisaram os efeitos da seca em raízes de dois cultivares de gergelim e observaram a presença de bandas da SOD similares em ambos os cultivares, embora tenham relatado a presença de bandas mais intensas no nível de seca mais severo.

Na Figura 2-B, são apresentados os perfis isoenzimáticos da POD de três espécies de bromélia. Nos poços 1, 2 e 3 foram aplicados extratos enzimáticos de *Portea petropolitana*, onde foi observada a presença de duas isoformas bem visíveis, uma de menor intensidade e outra de intensidade forte. Nos poços 7, 8 e 9 foram aplicadas amostras de *Billbergia horrida*, em que foram observadas duas isoformas de POD bem visíveis, sendo uma isoforma de menor intensidade e uma de intensidade forte. Nos poços 4, 5 e 6 foram aplicadas amostras de *Tillandsia polystachia*, para a qual não foi detectada atividade enzimática de peroxidase.

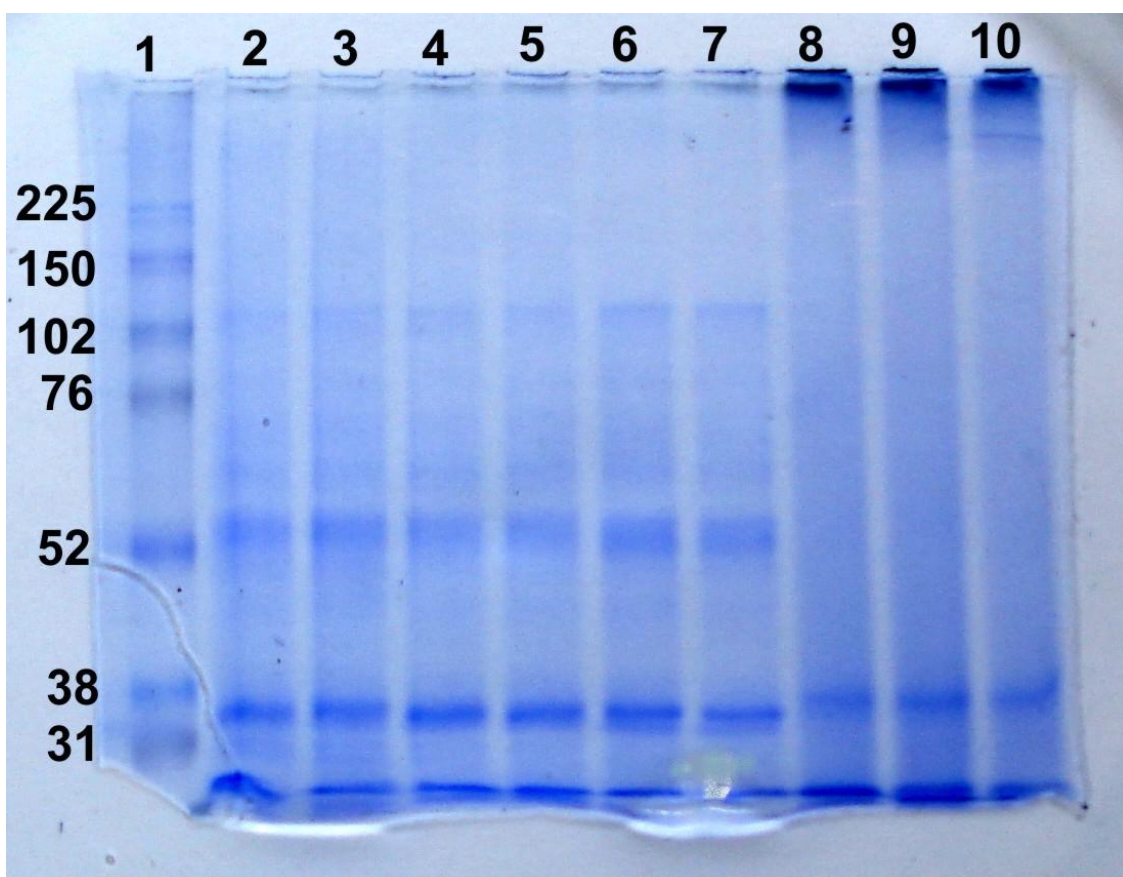


**Figura 2.** Géis de poliacrilamida nativos das isoenzimas da SOD e da POD de extratos de folhas de três indivíduos de *Tillandsia polystachia* estabelecidos em condições naturais em diferentes alturas de um forófito. **Gel A:** Indivíduo 1: poços 1, 2 e 3 (altura 1); poços 4, 5 e 6 (altura 2); poços 7, 8 e 9 (altura 3). **Gel B:** Indivíduo 1-*Portea petropolitana*: poços 1, 2 e 3 (região apical); Indivíduo 1-*Tillandsia polystachia*: poços 4, 5 e 6 (região apical); Indivíduo 1-*Billbergia horrida*: poços 7, 8 e 9 (porção apical).

### Eletoforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) é um método muito utilizado para a análise de massas moleculares de proteínas oligoméricas (Rocha *et al.*, 2005). O padrão de peso molecular aplicado no poço 1 do gel apresentava sete bandas, cujos pesos moleculares variaram de 225 a 31 kDa (Fig. 3). Os poços 2, 3 e 4 representam os perfis de proteínas de uma planta do estrato inferior (altura 1), onde foi observada um banda próxima à 102 kDa, várias bandas de menor intensidade entre 76 e 52 kDa, duas bandas bem definidas próximas à 52 kDa e uma banda com intensidade forte próximo à 38 kDa. Nos poços 5, 6 e 7 foi aplicada amostra proveniente de uma planta localizada no estrato mediano (altura 2). Essas amostras exibiram o mesmo perfil proteico que a amostra proveniente do estrato inferior, não havendo diferenças entre as bandas visualizadas. Nos poços 8, 9 e 10, referentes a amostras do estrato superior, foi observado um menor número de bandas, sendo perceptível um acúmulo de proteínas no início do gel de separação e uma banda próxima a 38 kDa, sendo esta banda comum a todos os demais poços. O estrato superior (altura 3) apresentou um perfil proteico diferente dos outros dois estratos.





**Figura 3:** Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos de folhas de três indivíduos de *Tillandsia polystachia* estabelecidos em condições naturais em diferentes alturas de um forófito. O poço 1 corresponde ao marcador de peso molecular. Os poços 2, 3 e 4 correspondem à altura 1. Os poços 5, 6 e 7 correspondem à altura 2. Os poços 8, 9 e 10 correspondem à altura 3.

### CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos no presente estudo possibilitaram o desenvolvimento de um protocolo eficiente de multiplicação e conservação *in vitro* de *Tillandsia polystachia*. As culturas foram eficientemente estabelecidas *in vitro* a partir de sementes. O tratamento que promoveu as maiores taxas de multiplicação *in vitro* de *T. polystachia* foi aquele suplementado com BAP, na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ . Em relação ao enraizamento, um maior número de raízes foi obtido em resposta à suplementação do meio de cultura com  $\text{GA}_3$ , a 10  $\mu\text{M}$ . Após três meses de cultivo *in vitro*, as plantas foram eficientemente aclimatizadas.

Nas análises espectrofotométricas, as enzimas CAT e SOD apresentaram padrões similares de atividade, com valores mais elevados nas plantas provenientes dos estratos inferior e superior, conforme também se observou para a POD. O mesmo padrão de resposta em relação à posição no forófito foi observado para conteúdo total de proteínas, com maiores quantidades nos indivíduos provenientes dos estratos inferior e superior.

Um mesmo padrão de isoenzimas da SOD foi observado nas plantas estabelecidas nos diferentes estratos de um forófito desenvolvido em condições naturais. A atividade da POD não foi detectada por meio de eletroforese nas plantas provenientes dos três estratos, embora tenha sido detectada por meio das análises espectrofotométricas, especialmente nas plantas provenientes dos estratos mediano e superior. Embora os perfis proteicos tenham diferido entre os estratos amostrados, os estratos inferiores e medianos exibiram maior número de bandas na eletroforese em gel desnaturante. As enzimas apresentaram diferentes padrões de atividades nos indivíduos provenientes dos diferentes estratos no forófito.

Relatos na literatura da ocorrência de atividade diferencial de enzimas antioxidativas em folhas de plantas de Bromeliaceae desenvolvidas em diferentes estratos de um forófito estão sendo apresentados pela primeira vez neste trabalho.

**Agradecimentos** - Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Apoio à Publicação da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-PROPESQ) pelo apoio financeiro. Também somos gratos ao Dr. Acelino Couto Alfenas e a Renildo de Oliveira, respectivamente, chefe e técnico de Laboratório de Patologia Molecular Florestal, Bioagro-UFV, pela importante contribuição nas análises de eletroforese. Agradecemos também aos responsáveis pelos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas do Bioagro (UFV) e Estrutura e Função de Proteínas, do Departamento de Bioquímica (UFJF).

## REFERÊNCIAS

- Aghaleh M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Razavi K (2014) Antioxidative enzymes in two *in vitro* cultured *Salicornia* species in response to increasing salinity. *Biol Plantarum* 58: 391-394
- Alfenas AC (2006) Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. Ed. UFV, Viçosa
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53:1331-1441
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol* 109:1247-1257
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, pp 227-287

- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287
- Benzing DH (2000) Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Bernardi R, Nali C, Ginestri P, Pugliesi C, Lorenzini G, Durante M (2004) Antioxidant enzyme isoforms on gels in two poplar clones differing in sensitivity after exposure to ozone. *Biol Plantarum* 48: 41-48
- Bhattacharjee S (2010) Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers p.1-30
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48-54
- Carpin S, Crèvecoeur M, Greppin H, Penel C (1999) Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol* 120: 799-819
- Carvalho GR, Pasqual M, Guimarães RJ, Mendes ANG, Antunes LEC, Silva AT (1998) Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaiá. *Pesqui Agropecu Bras* 33: 847-851
- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Method Enzymol* 2:764-775
- Cronquist A (1988) The evolution and classification of flowering plants. 2ed. The New York Botanical Garden, New York, USA
- Davis BJ (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci USA* 121:404-427
- Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 34:1023-1028
- Diniz JDN, Almeida JC, Teixeira ALA, Gomes ES, Hernandez FFF (2003) Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. *Ciênc agrotec* 27(4):934 - 938
- Fazeli F, Ghorbanli M, Niknam V (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biol Plantarum* 51:98-103
- Forzza RC (2005) Revisão taxonômica de (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). *Bol Bot Univ São Paulo* 23:1-49
- Forzza RC, Wanderley MGL (1998) Pitcairnioideae (Bromeliaceae) na Serra do Cipó, MG, Brasil. *Bol Bot Univ São Paulo* 17: 255-270

- Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: a molecular approach. - New Phytol 146:359-392
- Ghanati F, Morita A, Hiokota H (2005) Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. Plant and Soil 276: 133-141
- Gratão PL, Polle ALPJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Funct Plant Biol 32: 481-494
- Grattapaglia D, Machado MA (1998). Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, Brasília, 1: 233-237
- Gomes, FP (1982) Curso de Estatística Experimental. 10ª edição. São Paulo: Nobel. 430p
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiol 84: 450-455
- Hilaire, KT, Ahipo DE, Eugene JPKN, Niamké S, Justin KY, Mérillon JM (2008) Purification and characterization of cell suspensions peroxidase from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Applied Biochemistry and Biotechnology 157: 575-592
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol 57: 315-319
- Karuppanapandian T (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Aust J Crop Sci 5:709-725
- Kibinza S, Bazin J, Bailly C, Farrant JM, Corbineau F, El-Maarouf-Bouteau, H (2011) Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. Plant Science 181: 309-315
- Kochiba J, Button J, Spiegel-Roy P, Bornman CH, Kochiba M (1974) Stimulation of rooting of citrus embryoides by gibberellic acid and adenine sulphate. Ann Bot 38:795-802
- Kremer D (2011) O gênero Tillandsia L. (BROMELIACEAE- TILLANDSIOIDEAE) no estado do Paraná, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa
- Kumutha D, Ezhilmathi, K, Sairam, RK, Srivastava GC, Deshmukh PS, Meena RC (2009) Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. Biol Plantarum 53: 75-84, 2009
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 680-685
- Lee BR, Li LS, Jung WJ, Jin YL, Avic JC, Ourry A, Kim TH (2009) Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. Biol Plantarum 53: 505-510
- Lepedus H, Gaça V, Cesar V (2005) Guaiacol peroxidases and photosynthetic pigments during maturation of spruce needles. Croat Chem Acta 78: 355-360

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Macedo CEC, Silva MG, Nobrega FS, Martins PM, Barroso PAV, Alloufa MAI (2003) Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. *Rev Bras Frut* 25: 501-504
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59: 209-258
- Mendes GC, Soares CQG, Braga VF, Pinto LC, Santana R, Viccini LF, Peixoto PHP (2007) Multiplicação *in vitro* de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Rev Bras de Bioc* 5:972-974
- Meratan A, Ghaffari SM, Niknam V (2009) *In vitro* organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum* *Biol Plantarum* 53: 5-10
- Mercier H, Nievola CC (2003) Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1: 57-62
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-409
- Molassiotis AN, Sotiropoulos T, Tanou G, Kofidis G, Diamantidis G, Therios I (2006) Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biol Plantarum* 50: 61-68
- Moller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Phys* 52: 561-591
- Myers N, Mittermeier RA, YERS, N, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858
- Nievola CC, Kraus JE, Freschi L, Souza BM, Mercier H (2005) Temperature determines the occurrence of CAM or C<sub>3</sub> photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 832-837
- Pasqual M, Ribeiro VG, Ramos JD (1990) Influência do GA<sub>3</sub> e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja Natal. *Pesqui Agropecu Bras* 25: 1477-1482
- Pasqual M, Santos FC, Figueiredo MA, Junqueira MA, Rezende JC, Ferreira EA (2008) Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. *Hortic Bras* 26: 45-49
- Pedó T, Martinazzo EG, Aumonde TZ, Villela FA (2015) Desempenho de sementes, vigor e expressão isoenzimática em plântulas de teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrader) sob efeito da restrição hídrica. *R. bras. Bioci* 13: 5-9

- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'Anna, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzyme of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg* 11:137-143
- Pilatti FK, Aguiar T, Simões T, Benson EE, Viana AM (2011) *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47:82-98
- Procházková D, Wilhelmová N (2007) Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biologia Plantarum* 51:401–406
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161:1189-1202
- Ren J, Sun LN, Zhang QY, Song XS (2016) Drought Tolerance Is Correlated with the Activity of Antioxidant Enzymes in *Cerasus humilis* Seedlings. *BioMed Research International* Volume, 9 pages
- Resende CF (2012) Estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de *Pitcairnia encholirioides* L. B. SM (Bromeliaceae) após aclimatização e sob estresse hídrico. Dissertação de Mestrado-UFJF, Juiz de Fora
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conservation* 142:1141-1153
- Rocha TL, Costa RHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho MV, Paes NS, Silva MCM, Grossi-de Sá MF (2005) Eletroforese bidimensional e análise de protomas. Comunicado técnico- Embrapa
- Rudrappa T, Lakhmanan V, Kaunain R, Singara NM, Neelwarne B (2005) Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chem* 105:1312-1320
- Scandalios JG (1974) Subcellular localization of catalase variants coded by two genetic loci during maize development. *J Hered* 65:28-32
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 101:7-12
- Shafi A, Gill T, Sreenivasulu Y, Kumar S, Ahuja PS, Singh AK (2015) Improved callus induction, shoot regeneration, and salt stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing superoxide dismutase from *Potentilla atrosanguinea*. *Protoplasma* 252: 21-41
- Silva ALL, Franco ETH, Dornelles EB, Reichert BCL, Quoirin M (2009) *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E, Morrem (Bromeliaceae). *Iheringia Sér Bot* 64:151-156

- Simova-Stoilova L, Demirevska K., Petrova T, Tsenov N, Feller U (2008) Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil Environ* 54: 529-536
- Smith LB, Downs RJ (1974) Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, Hafner Press, 14: 1-658
- Soares JDR, Araujo AG, Pasqual M, Rodrigues FA, Assis FA (2009) Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento in vitro de plântulas de orquídea. *Ciência Rural* 39: 772-777
- Stebbins GL, Wendel LF (1989) Introduction. In: Soltis DE & Soltis PS (eds) *Isozymes in Plant Biology* (pp 1-3). Dioscorides Press, Portland, USA
- The Plant List (2013) Version 1.1. Published on the internet. Available in <http://www.theplantlist.org/>.(access in 08/05/2016)
- Uarrota VG, Moresco R, Schmidt EC, Bouzon ZL, Nunes EC, Neubert EO, Peruch LAM, Rocha M, Maraschin M (2016) The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry* 197: 737–746
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA (1971) Improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44: 301-305
- Zachos F, Habel J (2011) *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas*. Springer, Heidelberg/Dordrecht/London/New York
- Zheng YX, Wu, JC, Cao FL, Zhang YP (2010) Effects of water stress on photosynthetic activity, dry mass partitioning and some associated metabolic changes in four provenances of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Photosynthetica* 48: 361-369