

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

CRISTIANO FERRARA DE RESENDE

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM *Pitcairnia
enholirioides* L. B. SM. (BROMELIACEAE) *IN VITRO* E *EX VITRO* E
SOB DESIDRATAÇÃO

JUIZ DE FORA
MINAS GERAIS, BRASIL

2012

CRISTIANO FERRARA DE RESENDE

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM *Pitcairnia
encholirioides* L. B. SM. (BROMELIACEAE) *IN VITRO* E *EX VITRO* E
SOB DESIDRATAÇÃO

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto

JUIZ DE FORA
MINAS GERAIS, BRASIL

2012

CRISTIANO FERRARA DE RESENDE

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM *Pitcairnia
encholirioides* L. B. SM. (BROMELIACEAE) *IN VITRO* E *EX VITRO* E
SOB DESIDRATAÇÃO

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

Aprovada em: 05 de março de 2012.



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



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



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

Aos meus pais, Dorotéia e Cosme, dedico.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, às pessoas que conviveram e convivem mais comigo: aos meus pais, por terem proporcionado todas as condições necessárias à minha formação, por terem se dedicado a vida toda principalmente à minha educação e à dos meus irmãos. Todos nós sabemos que sem isso é quase impossível trilhar o caminho do contínuo aprendizado, e sou grato eternamente aos ensinamentos, orientações e puxões de orelha, que ao longo da vida me colocaram e colocam na direção certa.

Aos meus irmãos, pela convivência e pelos ensinamentos, pelos desafios impostos e pela oportunidade de ser o mais velho, muitas vezes ensinando e tantas outras aprendendo muito mais. À minha namorada Paula, que esteve ao meu lado durante a maior parte desses dois anos de mestrado, pelo companheirismo, amizade, presença, carinho e amor. Obrigado por compartilhar seus momentos comigo, por aceitar os meus e por fazer de ambos nossos momentos. Amo-te. Obrigado a todos vocês, pois sei que a convivência nem sempre é fácil de manter, e não posso dizer que eu seja uma pessoa fácil de lidar. Isso só enaltece o esforço de vocês.

Aos meus amigos Bruce, Júlio, Guilherme e Tiago, que conheci no ensino médio. Uma grande parte de mim foi construída nesse momento da vida, e eu seria negligente se deixasse de agradecer a vocês pela presença durante todo esse tempo, mesmo que não tão constante.

Aos meus colegas de laboratório, Cristiane, Paula, Ricardo, Vanessa e Virgínia. Seria impossível a realização desse trabalho sem a contribuição de vocês. Agradeço também pela mão-de-obra, mas mais pela convivência, pela troca de experiências e pelos ensinamentos dados.

Ao Laboratório de Genética da UFJF e aos seus responsáveis, pelo empréstimo da centrífuga e pelo tempo dedicado a nós, contribuindo com a realização das análises bioquímicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia (PGEcol) da UFJF, pelo apoio e pelos recursos oferecidos, e também pelas dificuldades impostas, sem as quais meu crescimento não seria completo.

Aos meus colegas de curso, em especial Philipe e Martins, pela presença e pelas conversas, e aos professores das disciplinas cursadas, pela contribuição.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Botânica do ICB da UFJF, pela ajuda diversa.

Ao meu professor e orientador Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto, a quem preciso agradecer de forma especial. Obrigado pela revisão constante desse trabalho, pelas modificações feitas e pelos retoques dados. Obrigado pela paciência, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados, pelas conversas sérias e pelas descontraídas também. Mesmo que em muitas delas possamos ter expressado nossa inquietante vontade de produzir e pesquisar mais, por vezes esboçando insatisfação, sei que muito trabalho virá pela frente, e isso só me motiva a perseverar nesse caminho.

Àqueles que contribuíram de alguma forma à realização desse trabalho, e àqueles que estiveram presentes em minha vida durante esses dois anos. Não posso aqui escrever todos os nomes, mas sintam-me agradecido.

Meu sincero muito obrigado a todos vocês.

Sumário

| | |
|--|----|
| Resumo..... | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| 1 – Introdução..... | 5 |
| 1.1 – A família Bromeliaceae..... | 5 |
| 1.2 – Cultivo <i>in vitro</i> de Bromeliaceae..... | 9 |
| 1.3 – Aclimatização <i>ex vitro</i> | 11 |
| 1.4 – Anormalidades metabólicas e estresse oxidativo..... | 12 |
| 2 – Material e Métodos..... | 23 |
| 2.1 – Material vegetal..... | 23 |
| 2.2 – Análises bioquímicas..... | 25 |
| 2.2.1 – Obtenção dos extratos brutos para determinação das proteínas totais, atividades enzimáticas, conteúdos de prolina e pigmentos fotossintéticos..... | 25 |
| 2.2.2 – Determinação do conteúdo de prolina..... | 26 |
| 2.2.3 – Determinação de proteínas totais..... | 26 |
| 2.2.4 – Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)..... | 27 |
| 2.2.5 – Determinação da atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6)..... | 27 |
| 2.2.6 – Determinação da atividade das enzimas peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) e polifenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1, EC 1.10.3.2 e EC 1.14.18.1)..... | 28 |
| 2.2.7 – Composição de pigmentos fotossintéticos..... | 28 |
| 2.2.8 – Teores de carboidratos..... | 28 |
| a) Determinação do teor de sacarose..... | 28 |
| b) Determinação do teor de carboidratos solúveis totais..... | 29 |
| c) Determinação do teor de amido..... | 30 |
| d) Determinação do teor de açúcares redutores..... | 30 |
| 2.3 – Delineamento experimental e análises estatísticas..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 3 – Resultados..... | 32 |
| 3.1 – Análises bioquímicas das plantas mantidas <i>in vitro</i> e após aclimatização <i>ex vitro</i> em casa de vegetação..... | 35 |
| 3.1.1 – Prolina..... | 35 |
| 3.1.2 – Proteínas totais..... | 37 |
| 3.1.3 – Enzimas do metabolismo antioxidativo (superóxido dismutase, catalase, peroxidase e polifenol oxidase)..... | 39 |
| a) Superóxido dismutase (SOD)..... | 39 |
| b) Catalase (CAT)..... | 41 |
| c) Peroxidase (POD)..... | 43 |
| d) Polifenol oxidase (PPO)..... | 43 |
| 3.1.4 – Pigmentos..... | 46 |
| a) Teores de clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i> | 46 |
| b) Teores de clorofilas totais e carotenoides totais..... | 48 |
| c) Relações clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i> e clorofilas totais/carotenoides totais..... | 50 |
| 3.2 – Análises bioquímicas das plantas submetidas à desidratação progressiva e posterior reidratação..... | 52 |
| 3.2.1 – Prolina..... | 53 |
| 3.2.2 – Proteínas totais..... | 56 |
| 3.2.3 – Enzimas do metabolismo antioxidativo (superóxido dismutase, catalase, peroxidase e polifenol oxidase)..... | 57 |
| a) Superóxido dismutase (SOD)..... | 57 |
| b) Catalase (CAT)..... | 59 |
| c) Peroxidase (POD)..... | 60 |
| d) Polifenol oxidase (PPO)..... | 61 |
| 3.2.4 – Pigmentos..... | 63 |
| a) Teores de clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i> | 63 |
| b) Teores de clorofilas totais e carotenoides totais..... | 65 |
| c) Relações clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i> e clorofilas totais/carotenoides totais..... | 65 |
| 3.2.5 – Carboidratos..... | 68 |
| a) Carboidratos solúveis totais (CST)..... | 68 |
| b) Sacarose..... | 69 |
| c) Açúcares redutores (AR)..... | 71 |
| d) Amido..... | 71 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 4 – Discussão..... | 73 |
| 4.1 – Prolina..... | 73 |
| 4.2 – Proteínas totais..... | 78 |
| 4.3 – Enzimas..... | 80 |
| 4.4 – Pigmentos..... | 86 |
| 4.5 – Carboidratos..... | 90 |
| 5 – Conclusões..... | 93 |
| 6 – Referências Bibliográficas..... | 94 |

Resumo

Bromeliaceae é uma família essencialmente neotropical, cujos representantes são muito utilizados para fins paisagísticos. Uma das principais fontes de abastecimento do mercado consumidor de bromélias é o extrativismo o que, associado à destruição do ambiente natural, tem levado a perdas irreparáveis na biodiversidade da família, especialmente na Mata Atlântica, onde cerca de 40% das espécies encontram-se sob alguma categoria de ameaça. *Pitcairnia encholirioides* L. B. Sm. é uma espécie “criticamente em perigo” de extinção, sendo conhecida somente uma população dessa espécie, com cerca de 900 indivíduos, encontrada em 2004 em um afloramento rochoso muito degradado e sujeito ao fogo e ao pisoteio de animais, no município de Santa Maria Madalena, RJ. A utilização das técnicas de micropropagação pode reverter os riscos de extinção garantindo taxas elevadas de multiplicação, fornecendo material necessário ao mercado consumidor, evitando, dessa forma, o extrativismo das plantas nos seus locais de origem. A instalação e a conservação *in vitro* de bancos de germoplasma possuem especial importância, garantindo a sobrevivência de espécies raras e/ou endêmicas e fornecendo plantas para iniciativas de reintrodução. A etapa final da micropropagação é a aclimatização *ex vitro*, realizada após os procedimentos de multiplicação e enraizamento *in vitro*. A aclimatização é um período crítico para as plantas devido à perda de água, o que causa estresse hídrico e, como consequência, estresse oxidativo, podendo provocar problemas metabólicos e perdas elevadas. No presente trabalho, *Pitcairnia encholirioides* foi cultivada *in vitro* por 150 dias em meio de cultura adicionado de dois reguladores de crescimento (GA_3 ou ANA), além de duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação dos tubos de ensaio (vedação hermética com tampas e filme de PVC ou vedação com tampas que permitiam trocas gasosas), totalizando 8 tratamentos, período após o qual as plantas foram transferidas para condições *ex vitro*, em casa de vegetação, permanecendo por mais 180 dias. Dois desses tratamentos foram selecionados para as análises de desidratação, quando suas plantas foram submetidas a 30, 42 ou 54 dias sem irrigação, além do controle irrigado periodicamente, sendo posteriormente reidratadas durante 90 dias. Após os períodos de cultivo *in vitro* e permanência das plantas em casa de vegetação, foram realizadas análises dos conteúdos de prolina, proteínas totais, atividades das enzimas do metabolismo antioxidativo SOD, CAT, POD e PPO, além

dos teores de pigmentos fotossintetizantes. Além desses parâmetros, após desidratação e reidratação foram também avaliados os teores de carboidratos. De maneira geral, o cultivo *in vitro* em meio adicionado da menor concentração de sacarose e em tubos vedados hermeticamente se mostrou prejudicial, o que foi evidenciado pelo menor acúmulo de prolina, aumentos nas atividades das enzimas antioxidativas e menor acúmulo de pigmentos fotossintéticos. Após o período de aclimatização, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos para a maioria dos parâmetros analisados, ou os dados oscilaram de maneira a não permitir uma generalização quanto aos efeitos residuais da sacarose, do tipo de tampa e dos reguladores de crescimento utilizados durante o cultivo *in vitro*. No período em que as plantas foram submetidas à desidratação progressiva, houve maior acúmulo de prolina e proteínas solúveis totais, além de aumento nos teores de pigmentos fotossintéticos nos tecidos provenientes de plantas cultivadas *in vitro* em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃. Houve também, em geral, queda mais acentuada nas atividades das enzimas em meio suplementado com a menor concentração de sacarose e ANA, além de oscilações nos teores de pigmentos. As relações entre os pigmentos sofreram leve redução em ambos os tratamentos, e os teores de carboidratos solúveis totais, sacarose, açúcares redutores e amido aumentaram com o prolongamento do estresse. Após a reidratação, todas as plantas demonstraram elevada capacidade de recuperação, apresentando em todas as análises realizadas valores muito similares aos das plantas do controle, não submetidas à desidratação. Os resultados obtidos no trabalho permitem concluir que o cultivo *in vitro* em meio adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e em tubos de ensaio que permitem trocas gasosas é o mais apropriado para plantas de *P. encholirioides*. Ademais, a concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura também influencia o desenvolvimento das plantas após aclimatização, sendo encontrados melhores resultados em plantas cultivadas nos meios de cultura suplementados com a maior concentração desse carboidrato. Acredita-se que as plantas cultivadas nessas condições apresentariam maior capacidade de sobrevivência ao transplântio e maior resistência a períodos prolongados de estresse hídrico, aos quais, frequentemente, estão submetidas no ambiente natural.

Palavras-chave: Bromeliaceae, *Pitcairnia encholirioides*, micropropagação, aclimatização, estresse oxidativo, estresse hídrico, prolina, superóxido dismutase, catalase, peroxidase, polifenol oxidase, pigmentos fotossintéticos, carboidratos.

Abstract

Bromeliaceae is essentially a neotropical family, whose representatives are widely used for landscaping. One major source of supply for the consumer market is the extraction, which coupled with the destruction of the natural environment, has led to irreparable losses in biodiversity of the family, especially in the Atlantic Forest, where about 40% of bromeliad species are under some category of threat. *Pitcairnia encholirioides* L. B. Sm. is a critically endangered species. In 2004, a unique population of this species was found, with about 900 individuals in a very degraded rocky outcrop, subject to fire and trampling by animals, located in Santa Maria Madalena, RJ. The use of micropropagation can guarantee high multiplication rates, providing necessary material for the consumer market, effectively obviating the extraction of plants in their places of origin. In addition, installation and *in vitro* conservation of germplasm banks have special importance, ensuring the survival of rare species and/or endemic and providing micropropagated plants for reintroduction initiatives. Following the procedures of *in vitro* multiplication and rooting, the final stage of micropropagation is the *ex vitro* acclimatization, a critical period for the plants due to water loss, which causes water stress and, consequently, oxidative stress, which can cause metabolic problems and high losses. In this study, *Pitcairnia encholirioides* was grown for 150 days *in vitro* in a culture medium supplemented with two growth regulators (GA₃ or NAA), and two concentrations of sucrose (15 or 30 g L⁻¹) in two types of sealing of test tubes (hermetic seal with lids and PVC film and seal with lids that allowed gas exchange), totaling eight treatments, after which the plants were transferred to *ex vitro* conditions in a greenhouse, staying for more than 180 days. Two of these treatments were selected for analysis of dehydration when their plants were subjected to 30, 42 or 54 days without irrigation, apart from control irrigated periodically, being subsequently rehydrated for 90 days. After periods of *in vitro* cultivation and maintenance of the plants in the greenhouse, they were analyzed for proline content, total protein, activities of antioxidant metabolism enzymes SOD, CAT, POD and PPO, besides the content of photosynthetic pigments. Apart from these parameters, after dehydration and rehydration, levels of carbohydrates were also assessed. In general, the *in vitro* culture in medium containing the lowest concentration of sucrose and hermetically sealed tubes proved to be harmful, which was evidenced by lower levels of proline, increased

activity of antioxidant enzymes and lower accumulation of photosynthetic pigments. After the acclimatization period, no differences were found between treatments for most parameters, or data varied so as to not allow a generalization about the residual effects of sucrose, the type of cover and of the growth regulators used in the *in vitro* cultivation. During the period in which the plants were subjected to water stress, higher accumulation of proline and total soluble proteins occurred, and also increased levels of photosynthetic pigments in tissues from plants grown *in vitro* in medium containing 30 g L⁻¹ sucrose and GA₃. There was also, in general, sharper decrease in enzyme activity in medium with the lowest concentration of sucrose and NAA, as well as fluctuations in pigment. Relations between pigments suffered slight reduction in both treatments, and total soluble carbohydrates, sucrose, reducing sugars and starch increased with increasing stress. After rehydration, all plants showed high resilience, presenting for all analyzes values very similar to those of control plants not subjected to dehydration. The results indicate that the *in vitro* culture in medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and tubes that allow gas exchange are the most appropriate. Moreover, the concentration of sucrose added to the culture medium also influences the development of plants after acclimatization, with best results found in plants grown in media supplemented with higher amount of this carbohydrate. It is believed that plants grown under these conditions would have higher capacity of resistance to transplanting and could survive for prolonged periods of water stress, which are often subjected in the natural environment.

Keywords: Bromeliaceae, *Pitcairnia encholirioides*, micropropagation, acclimatization, oxidative stress, water stress, proline, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, photosynthetic pigments, carbohydrates.

1 – Introdução

1.1 – A família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae Juss. conta, atualmente, com aproximadamente 3172 espécies distribuídas entre 58 gêneros (Luther, 2008), sendo a quinta maior família em número de espécies entre as monocotiledôneas (Givnish, 2005). Segundo Cronquist (1981; 1988), Bromeliaceae é a única família da ordem Bromeliales, subclasse Zingiberidae, classe Liliopsida, divisão Magnoliophyta, sendo tradicionalmente dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Smith & Downs, 1974; Cronquist, 1988), caracterizadas principalmente com base em suas características florais, no hábito e na morfologia dos frutos e sementes.

Bromeliaceae apresenta distribuição essencialmente neotropical (Smith & Downs, 1974; Porembski & Barthlott, 1999; Jacques-Felix, 2000), sendo a única exceção *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed, que ocorre no oeste do continente africano. Possui três grandes centros de diversidade genética: a costa leste do Brasil, nos domínios da Mata Atlântica, o Escudo das Guianas e os Andes (Smith & Downs, 1974; Martinelli *et al.*, 2008), sendo que no primeiro caso predominam táxons intimamente relacionados a formações florestais e nos dois outros prevalecem táxons associados a formações campestres (Forzza, 2005).

A família representa um importante componente florístico e fisionômico em diferentes formações vegetais (Versieux *et al.*, 2008). Quanto ao hábito de vida, há uma escala de ocupação, desde representantes terrestres enraizados no solo, passando por epífitas e rupícolas acumuladoras de água e nutrientes, até epífitas extremas completamente independentes do substrato para nutrição (Crayn *et al.*, 2004; Versieux *et al.*, 2008). Mais da metade das espécies cresce como epífita, com raízes fixadas aos troncos de árvores ou em outros substratos, funcionando apenas como suporte para a planta, que recolhe água da umidade do ar, do orvalho e das chuvas através das folhas, ao invés de retirá-la do solo (Martinelli, 2000).

Estima-se que do total de espécies, mais de 40% podem ser encontradas no Brasil, o que coloca nosso país entre os mais importantes em termos de diversidade na família (Leme, 1997). Com relação aos gêneros, cerca de 80% ocorrem no território

brasileiro, e destes, 22% são restritos ao mesmo (Forzza, 2005). São particularmente comuns em florestas úmidas, principalmente na Mata Atlântica, onde correspondem a uma das principais famílias entre as epífitas. Também são muito comuns em habitats xerofíticos (Judd *et al.*, 2009), particularmente nas caatingas e campos rupestres (Souza & Lorenzi, 2005), com representantes de vida terrestre e rupícola.

As bromélias apresentam folhas alongadas, mais ou menos côncavas, tipicamente agrupadas na base da planta formando uma roseta, e suas bases foliares expandidas formam uma cisterna ou tanque que acumula água da chuva. Esse ambiente aquático é denominado fitotelmo (ou fitotelmata) e constitui um micro-habitat para vários grupos de organismos vegetais e animais, com um total de mais de 900 espécies já encontradas nesses locais (Oliveira *et al. apud* Carneiro *et al.*, 1999; Martinelli, 2000; Mestre *et al.*, 2001), havendo uma ampla gama de relações ecológicas entre as bromélias e os organismos associados, bem como destes entre si. Esse sistema garante aos animais abrigo contra predadores, seca, vento e chuvas (Benzing, 2000), além de oferecer nutrientes e água, sendo assim responsável pelo aumento dos recursos que podem ser utilizados pela fauna local (Favretto *et al.*, 2011). Esse fato tem especial importância em ambientes com pouca disponibilidade hídrica, como as restingas, pois a quantidade total de água reservada pelas bromélias pode ser elevada (Cogliatti-Carvalho *et al.*, 2010), e também para as espécies epífitas que ocorrem no estrato superior, onde uma pequena quantidade de chuva é suficiente para garantir o abastecimento de água à planta e aos organismos associados (Mestre *et al.*, 2001). Sendo assim, as Bromeliaceae são reconhecidas de fundamental importância tanto para as comunidades que nelas se desenvolvem como para a manutenção da complexidade e diversidade dos ecossistemas nos quais ocorrem, especialmente na Mata Atlântica (Oliveira *et al. apud* Carneiro *et al.*, 1999).

A capacidade de acumular água é, provavelmente, uma das principais características das bromélias, conferindo a elas resistência às condições adversas de escassez hídrica no ambiente. Além do acúmulo de água na base das folhas, outras adaptações conferem às bromélias alta capacidade de estabelecimento e sobrevivência em ambientes sob condições adversas para a vida vegetal, destacando-se o caule reduzido, raízes pouco desenvolvidas, folhas adaptadas ao clima árido e tricomas foliares que absorvem água e nutrientes, além de apresentarem o metabolismo ácido das crassuláceas (MAC), encontrado comumente em espécies terrestres e epífitas (Benzing

et al., 1976; Medina, 1990; Benzing, 2000; Endres & Mercier, 2003; Crayn *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, os estudos florísticos e revisões taxonômicas em Bromeliaceae ampliaram-se significativamente, sendo marcante o acréscimo de novas coleções aos herbários e o número de novas espécies descritas (Versieux *et al.*, 2008). Apesar disso, devido à complexidade de delimitação dos gêneros e ao fato de alguns destes ocorrerem em áreas limítrofes do Brasil, é possível que o número de espécies seja bastante incompleto em relação ao que, de fato, ocorre no território brasileiro (Souza & Lorenzi, 2005).

Devido à grande diversidade de espécies, típica arquitetura foliar e variação morfológica, as bromélias ocupam lugar de destaque entre as plantas ornamentais comercializadas no Brasil (Pereira *et al.*, 2008), tornando-se mais populares durante as duas últimas décadas, devido ao uso para fins paisagísticos em casas e jardins (Versieux & Wendt, 2007). Em função disso, o extrativismo passou a ser uma das principais fontes de abastecimento do mercado (Coffani-Nunes & Forzza, 2001). A coleta predatória de exemplares para comercialização, associada à depredação dos ambientes naturais, são os principais responsáveis pela drástica redução ou até mesmo pela extinção de inúmeras espécies (Pereira *et al.*, 2008). Os gêneros frequentemente cultivados como ornamentais são *Aechmea*, *Alcantarea*, *Billbergia*, *Bromelia*, *Guzmania*, *Neoregelia*, *Pitcairnia*, *Tillandsia* e *Vriesea*, dentre outros (Souza & Lorenzi, 2005; Judd *et al.*, 2009).

A Mata Atlântica, um dos ecossistemas mais ricos do planeta, é considerada um dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade e está entre as oito áreas prioritárias para conservação mundial (Myers *et al.*, 2000; Rosumek *et al.*, 2008). Porém, é um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo, restando atualmente aproximadamente 7,26% de sua extensão original (Morellato & Haddad, 2000; Pilatti *et al.*, 2011). Nesse ecossistema, a família Bromeliaceae é uma das mais importantes, apresentando elevada riqueza, diversidade e endemismo, além de ser a que possui o mais alto número de espécies ameaçadas, colocando a família como prioridade em programas de conservação da biodiversidade (Pilatti *et al.*, 2011).

Dentre 953 táxons específicos e infraespecíficos de Bromeliaceae registrados na Mata Atlântica (Martinelli *et al.*, 2008), 338 encontram-se citados em alguma das listas oficiais de espécies ameaçadas, com 54 espécies incluídas na categoria “criticamente em perigo” (CR), 89 “em perigo” (EP), 182 “vulneráveis” (VU) e 17 “raras” (R). Dessa

maneira, dentre as espécies registradas na Mata Atlântica, cerca de 40% encontram-se sob alguma categoria de ameaça. É bastante provável que este número esteja subestimado devido ao pouco conhecimento do real estado de conservação das populações em ambientes naturais, bem como pelo número reduzido de espécimes depositados nos herbários, o que compromete a avaliação da distribuição geográfica dos táxons (Martinelli *et al.*, 2008).

Como resultado dos trabalhos do workshop de revisão da “Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção”, realizado em 2005 pela Fundação Biodiversitas, um grande número de espécies de Bromeliaceae foi incluído nas categorias de “vulnerável”, “em perigo” ou “criticamente em perigo” (Fundação Biodiversitas, 2005). Além destas categorias, três espécies foram consideradas “extintas na natureza”.

Pitcairnia L’Héritier é o maior gênero e o mais amplamente distribuído da subfamília Pitcairnioideae (Smith & Downs, 1974), compreendendo 376 taxa (incluindo espécies, variedades e formas) (Leme *et al.*, 2010). Atualmente, 43 espécies podem ser contabilizadas no território brasileiro, sendo encontradas em torno de 15 espécies na costa leste do país. Elas ocorrem especialmente nos campos de altitude e nos *inselbergs* nos domínios da Mata Atlântica, sendo o Rio de Janeiro o estado com maior diversidade, contabilizando nove espécies (Martinelli & Forzza, 2006). Dentre as cinco espécies do gênero *Pitcairnia* incluídas na lista de espécies ameaçadas da Fundação Biodiversitas, quatro foram classificadas na categoria “criticamente em perigo”, sendo que três ocorrem no estado do Rio de Janeiro, nos domínios da Mata Atlântica (Fundação Biodiversitas, 2005).

Pitcairnia encholirioides L. B. Sm., espécie alvo do presente trabalho, é bastante rara. Até 2004 era conhecida apenas pela coleção-tipo, coletada em 1934 e descrita por Smith em 1950. Em 2004 foi encontrada uma única população dessa espécie em um afloramento rochoso muito degradado, sujeito à passagem de fogo e pisoteio de animais, localizado em uma propriedade particular, no município de Santa Maria Madalena, RJ. Por ter sido localizada uma única população, com cerca de 900 indivíduos, que ocorrem em associação com espécies de *Vellozia* e *Barbacenia* (Velloziceae), *Tibouchina* (Melastomataceae) e *Alcantarea* (Bromeliaceae), e por talvez estar entre as mais ameaçadas do Rio de Janeiro, a espécie foi incluída na categoria de “criticamente em perigo” de extinção (Fundação Biodiversitas, 2005; Martinelli & Forzza, 2006).

1.2 – Cultivo *in vitro* de Bromeliaceae

A conservação da biodiversidade é um assunto cada vez mais em pauta, em vista do acelerado processo de degradação do meio ambiente e à conseqüente ameaça de extinção de espécies. Diversas metodologias podem ser adotadas para a conservação dos recursos vegetais, que pode ser realizada através da manutenção de coleções de plantas *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*, em casas de vegetação, sob criopreservação ou, ainda, *in vitro*, em condições de laboratório (Fay, 1994; Vieira, 2000).

A utilização da biotecnologia para a produção de plantas *in vitro* é conhecida por cultura de tecidos ou micropropagação, sendo utilizada há mais de 50 anos (Zornig, 1996). Apesar de muitas vezes esses termos serem usados como sinônimos, a micropropagação é a aplicação prática da cultura de tecidos, tratando-se de um tipo de propagação vegetativa realizada *in vitro* usando explantes pequenos.

Ultimamente, com o uso crescente das bromélias em projetos paisagísticos e a conseqüente ameaça de extinção de espécies devido ao extrativismo, há uma preocupação cada vez maior com a conservação desse recurso vegetal. No Brasil, a família Bromeliaceae é a que apresenta o maior número de espécies em perigo de extinção. Esse fato, associado ao grande endemismo de diversas espécies, tem aumentado as medidas de conservação da biodiversidade da família, com a utilização do cultivo *in vitro* e da criopreservação (Pilatti *et al.*, 2011). Para espécies com distribuição restrita ou fragmentada e mais raras, medidas de conservação e propagação *ex situ* são fortemente recomendadas, visando conferir maior segurança contra uma eventual extinção na natureza e, também, com objetivo de desencorajar práticas extrativistas prejudiciais à perpetuação das populações (Vieira, 2006).

Os primeiros trabalhos envolvendo o cultivo *in vitro* de Bromeliaceae foram desenvolvidos na década de 1970 (Mapes, 1973). Nas duas últimas décadas, diversos trabalhos foram publicados na literatura, muitos deles envolvendo espécies ameaçadas de extinção (Mercier & Kerbauy, 1992; 1993; 1994; 1995; 1997; Carneiro *et al.*, 1998; 1999; Arrabal *et al.*, 2002; Carneiro & Mansur, 2004; Droste *et al.*, 2005; Pompelli *et al.*, 2005; Rech Filho *et al.*, 2005; 2009; Pickens *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2010; Mollo *et al.*, 2011). Em contraste, é interessante notar que, para bromélias,

o uso do cultivo *in vitro* visando à realização de pesquisas fisiológicas básicas é raro (Nievola *et al.*, 2005).

Segundo Zornig (1996), as Bromeliaceae podem ser reproduzidas quase que em sua totalidade por cultura de tecidos. Os sistemas de cultivo podem incluir, basicamente, a propagação através de sementes, com a germinação *in vitro*, cultura de segmentos nodais, regeneração a partir de explantes foliares e produção de sementes sintéticas (Carneiro *et al.*, 1999; Arrabal *et al.*, 2002; Soneji *et al.*, 2002; Droste *et al.*, 2005; Pickens *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010, Souza *et al.*, 2010). Além desses métodos convencionais, a regeneração *in vitro* baseada na indução de culturas nodulares tem ganhado destaque nos últimos anos. Algumas espécies têm sido propagadas dessa forma, como *Ananas comosus* (Teng, 1997), *Vriesea reitzii* (Rech Filho *et al.*, 2005; 2009; Alves *et al.*, 2006; Dal Vesco & Guerra, 2010) e *Billbergia zebrina* (Dal Vesco *et al.*, 2011).

Dentre as opções, em trabalhos que têm por objetivo a conservação da biodiversidade e a reintrodução de espécies, a utilização de sementes no estabelecimento de culturas *in vitro* é considerada uma das melhores, uma vez que a variabilidade do material pode ser mantida (Carneiro & Mansur, 2004). Em contraste, nas demais formas em que a clonagem predomina, há a geração de indivíduos geneticamente idênticos aos seus genitores, o que, por sua vez, é importante na propagação comercial (Hartmann *et al.*, 2002), uma vez que caracteres vantajosos comercialmente podem ser selecionados e propagados.

Os meios de cultura mais empregados para o cultivo *in vitro* de Bromeliaceae são o meio de Murashige & Skoog (1962) – MS e o meio de Knudson (1946) – K, em suas formulações básicas ou diluídas (Mercier & Kerbauy, 1997; Paiva *et al.*, 2006). A composição e a concentração de auxinas e citocininas no meio de cultura são fatores determinantes para o crescimento e para o padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos (Galvanese *et al.*, 2007). Os principais reguladores de crescimento utilizados nos cultivos *in vitro* de bromélias são o ácido naftaleno acético (ANA) e a benzilaminopurina (BAP), isoladamente ou combinados (Mercier & Kerbauy, 1997), além do ácido giberélico (GA₃). Outras substâncias, como o ácido indolacético (AIA), o ácido indolbutírico (AIB) e a cinetina (KIN), são utilizadas em menor escala (George *et al.*, 2008).

Plantas MAC geralmente possuem limitações em sua capacidade reprodutiva, e os indivíduos da família Bromeliaceae apresentam, sob condições naturais, taxas de

propagação muito lentas. Sendo assim, a cultura de tecidos representa uma opção bastante atrativa, demonstrando vantagens em relação aos métodos convencionais por conseguir taxas elevadas de obtenção de mudas a partir de uma única gema, em período reduzido de tempo e gerando plantas totalmente livres de problemas fitossanitários (Mercier & Kerbauy, 1995; Malda *et al.*, 1999; Barboza *et al.*, 2004; Paiva *et al.*, 2006).

Especialmente com relação à família, a instalação e a conservação *in vitro* de bancos de germoplasma se revestem de especial importância, uma vez que diversas espécies encontram-se ameaçadas de extinção em decorrência de práticas extrativistas e de outras ações do homem sobre seus habitats, o que se agrava ainda mais para as espécies endêmicas, que podem ser irreversivelmente perdidas em decorrência da destruição dos seus ecossistemas. Portanto, as técnicas da cultura de tecidos são ferramentas valiosas para a propagação em massa de bromélias, subsidiando a produção comercial de espécies ornamentais e fornecendo plantas micropropagadas para reintrodução, o que é de fundamental importância para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (Dal Vesco *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). Somado a isso, o desenvolvimento de estratégias de exploração sustentável poderia contribuir para o desenvolvimento econômico das comunidades que têm como base econômica o cultivo e a comercialização de bromélias (Pickens *et al.*, 2006).

1.3 – Aclimatização *ex vitro*

Após os procedimentos de multiplicação e enraizamento *in vitro*, a micropropagação somente é concluída com o transplântio das plantas para condições *ex vitro*, em casas de vegetação. É necessário que as plantas passem por esse período de adaptação às condições *ex vitro*, onde elas são submetidas a uma fase de aclimatização e de endurecimento, o que faz com que a sobrevivência das plantas no ambiente externo seja aumentada. Esta prática é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante no sucesso da micropropagação. Isto se deve basicamente a quatro fatores: 1) a planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, devido à baixa intensidade de luz e à elevada umidade relativa, existentes dentro do frasco de cultivo, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando susceptível ao estresse hídrico; 2) a planta passa de uma existência heterotrófica, na qual depende de

um suprimento externo de energia (sacarose do meio de cultura), para um estado autotrófico, no qual precisa realizar fotossíntese para sobreviver; 3) a planta passa de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes no meio para outra onde precisa rapidamente incrementar a absorção de sais; e 4) a planta passa de um ambiente asséptico para outro onde está sujeita ao ataque de microrganismos saprófitos e, eventualmente, patogênicos (Grattapaglia & Machado, 1998; Hazarika, 2003).

Existem na literatura diversas publicações que relatam os detalhes dos procedimentos de transplante e de aclimatização, as dificuldades e as soluções encontradas durante essa importante etapa da micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1998; Pospíšilová *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2002). O sucesso nessa etapa depende basicamente da qualidade das plantas provenientes das fases de multiplicação e de enraizamento *in vitro*, o que, por sua vez, está estritamente relacionada com as condições pelas quais as plantas passam durante o crescimento nos frascos de cultivo. Compreender como otimizar as condições ambientais durante a aclimatização pode reduzir a excessiva perda de plantas que ocorre em muitos casos (Faisal & Anis, 2009).

Após aclimatização *ex vitro* em casas de vegetação, o último passo no processo de reintrodução das plantas no ambiente natural é a sua transferência para condições de campo, onde inevitavelmente sofrem com períodos de estiagem e seca. O déficit hídrico que ocorre com a seca é geralmente acompanhado por outras tensões, que são também desafios ao desenvolvimento das plantas, especialmente o déficit de água no solo e o alto déficit de pressão de vapor, que são frequentemente associados a temperaturas elevadas, alta irradiância, estresse oxidativo, salinidade, diminuição da disponibilidade de nutrientes e resistência mecânica ao crescimento radicular no solo compactado (Wilkinson & Davies, 2010). O desenvolvimento *in vitro* de plantas morfofisiologicamente capazes de resistir a essas condições estressantes é fundamental para o sucesso dos procedimentos de micropropagação e de produção de plantas com objetivos comerciais ou de conservação biológica.

1.4 – Anormalidades metabólicas e estresse oxidativo

Durante o crescimento *in vitro* podem ocorrer diversas anormalidades morfológicas, anatômicas e fisiológicas, devido às condições especiais que as plantas

enfrentam (Pospíšilová *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 2003; Hazarika, 2006; Pickens *et al.*, 2006). Dentro dos frascos de cultivo, a umidade relativa do ar é alta, há reduzida ventilação e baixa concentração de CO₂ (durante o período luminoso), além de elevado acúmulo de etileno (Mohamed & Alsdon, 2010). Além disso, o cultivo é realizado em meio suplementado com carboidratos como fonte energética e reguladores de crescimento, e as plantas são mantidas em salas de crescimento sob baixa irradiância (Arigita *et al.*, 2010; Badr *et al.*, 2011). Tais condições causam estresses nas plantas e podem acarretar elevadas perdas, limitando inclusive o uso generalizado da micropropagação (Bařková *et al.*, 2008).

No cultivo *in vitro* há redução na atividade fotossintética dos tecidos, quer devido à falta de CO₂ ou à produção de etileno nesse ambiente fechado, ou, também, devido à inibição por *feedback* das enzimas do ciclo de Calvin pela sacarose adicionada ao meio de cultura (Tanaka *et al.*, 2005; Jackson *et al. apud* Aragón *et al.*, 2010). A presença da sacarose inibe especificamente a formação das clorofilas, tornando menos viável o crescimento autotrófico (George *et al.*, 2008), e apesar de ser fonte de carbono para o crescimento *in vitro*, esse carboidrato atua como um agente osmótico que pode causar estresse hídrico acima de determinadas concentrações (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2002). Além disso, a alta umidade relativa do ar e o acúmulo de etileno em frascos fechados acarretam alta densidade estomática e levam ao desenvolvimento de estômatos anormais (Mohamed & Alsdon, 2010), além do acúmulo de água nos tecidos, fenômeno conhecido como hiperidricidade. A hiperidricidade é um dos maiores problemas na micropropagação das plantas, sendo caracterizada pela presença de tecidos muito hidratados, translúcidos e quebradiços, bem como por disfunções fisiológicas, como a redução nas taxas de transpiração e de fotossíntese (Joyce *et al.*, 2003; Kevers *et al.*, 2004; Saher *et al.*, 2005; George *et al.*, 2008). Tecidos hiperídricos são facilmente danificados pela dessecação e sobrevivem muito pouco quando transferidos para o ambiente externo (George *et al.*, 2008).

Além desses problemas que ocorrem *in vitro*, após a transferência das plantas para condições *ex vitro* elas podem ser facilmente danificadas por mudanças bruscas nas condições ambientais, na medida em que vão para ambientes com baixa umidade relativa do ar e elevada irradiância, o que causa problemas no funcionamento dos estômatos e na deposição da cutícula. Todo esse quadro causa estresse hídrico e fotoinibição, dois importantes fatores responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, pelo estresse oxidativo (Aragón *et al.*, 2010).

Na fase de transplântio, o estresse hídrico das plantas é, geralmente, o principal problema. Mesmo em plantas aparentemente perfeitas *in vitro*, uma série de deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração após a transferência *ex vitro* pode ocorrer, resultando numa rápida perda de água. Os estômatos não são funcionais e respondem muito lentamente ao estresse hídrico, a camada de cera protetora sobre as folhas é mínima ou inexistente e a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda é precário para permitir um fluxo transpiratório adequado (Hartmann *et al.*, 2002).

Em condições naturais, as bromélias possuem elevada capacidade de resistência às adversidades ambientais. O fato de apresentarem metabolismo ácido das crassuláceas (MAC) confere a elas capacidade de sobrevivência em muitos ambientes hostis às demais plantas. O metabolismo MAC, no qual a maior parte da aquisição de carbono ocorre durante o período noturno, evita a formação de EROs por manter altas concentrações de carbono durante o dia. Assim, a assimilação diurna constante de CO₂ previne a super energização da maquinaria fotossintética, controlando a fotoinibição e o estresse oxidativo sob níveis moderados de intensidade luminosa ou condições de limitação hídrica (Smirnoff, 1993; Niewiadomska & Borland *apud* González-Salvatierra *et al.*, 2010). De acordo com estes autores, há pouca evidência para suportar a ocorrência de estresse ou dano oxidativo em plantas MAC em condições de campo, pois o desempenho fotossintético é otimizado por uma interação entre processos que aumentam a atividade enzimática e a abundância de metabólitos envolvidos na destruição e eliminação de EROs. Somado a isso, as espécies de bromélias C₃-MAC facultativas podem ser induzidas ao metabolismo fotossintético MAC pelo estresse hídrico, o que garante uma maior eficiência no uso da água por essas plantas (Freschi *et al.*, 2007). Através dessa forma de alternância do metabolismo, as plantas podem regular a excessiva perda de água em condições de estresse e ter a sua sobrevivência aumentada.

No entanto, esses fatos não podem ser considerados em plantas que foram cultivadas *in vitro* e/ou que passaram por um período de aclimatização *ex vitro*, devido às próprias particularidades do desenvolvimento das plantas sob essas condições artificiais. Diversas metodologias podem ser adotadas para reduzir a ocorrência de anormalidades nas plantas, fazendo com que o ambiente de cultivo *in vitro* seja o mais semelhante possível ao ambiente natural de crescimento. Uma delas é a modificação do sistema de vedação dos frascos de cultivo.

Os efeitos de dois diferentes sistemas de vedação, hermético e não-hermético, sobre o crescimento *in vitro* e sobre o conteúdo de clorofilas foram avaliados por Chanemougasoundharam *et al.* (2004). Plântulas de batata (*Solanum tuberosum*) cultivadas em frascos fechados hermeticamente apresentaram peso fresco elevado (hiperhidricidade), diversas anormalidades morfológicas, alto índice de senescência e teores de clorofilas reduzidos, o que é muito prejudicial no processo posterior de aclimatização em condições *ex vitro*. O tipo de tampa utilizada para o fechamento dos frascos de cultura pode, dessa forma, influenciar diretamente o sucesso da aclimatização. Chen *et al.* (2006a) observaram redução nos parâmetros de crescimento e na taxa de aclimatização *ex vitro* em explantes de uma espécie medicinal cultivada em sistemas empregando o fechamento com papel alumínio, em comparação com sistemas com tampas que possibilitavam trocas gasosas. Estudos de microscopia eletrônica evidenciaram que plantas cultivadas em atmosfera ventilada apresentavam menor densidade estomática, além de células estomáticas de menor tamanho, o que resultou em uma maior taxa de sobrevivência dessas plantas durante a aclimatização *ex vitro*. Além desses fatores, Chen *et al.* (2006b) observaram que plantas cultivadas em recipientes fechados com papel alumínio apresentavam maior incidência de tecidos hiperídricos, ausência de cera epicuticular e estômatos não-funcionais, o que reduz a sobrevivência ao transplantio.

A prevenção da hiperhidricidade pode ser conseguida pelo aumento da concentração do agente gelificante no meio de cultivo, pelo acúmulo de solutos ou pela redução da água nos tecidos, quando eles são colocados em contato com o ar. A ventilação do tubo de ensaio reduz a umidade relativa do ar, promove a evaporação da água do meio de cultura e a transpiração, havendo a normalização do funcionamento dos estômatos, o que garante o adequado nível de hidratação dos tecidos e o controle da perda de água quando as plantas são aclimatizadas em condições *ex vitro* (Seelye *et al.*, 2003; Casanova *et al.*, 2008; George *et al.*, 2008; Ivanova *et al.*, 2010).

Pré-tratamentos com redução da umidade relativa na atmosfera do frasco de cultura podem ser aplicados para aumentar a sobrevivência ao transplantio. Brained & Fuchigami (1981) aumentaram a sobrevivência das plantas abrindo as tampas dos frascos ainda na sala de incubação, durante 4 a 5 dias antes do transplantio, submetendo as plantas a uma umidade relativa de 30 a 40%, bem menor do que a existente quando os frascos se encontravam vedados. Essa pré-aclimatização resultou numa adaptação

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

A ventilação dos tubos de ensaio induz a mudança das plantas do estado heterotrófico para o autotrófico, levando-as a fixar CO₂ e utilizá-lo para produzir a energia necessária ao seu crescimento e desenvolvimento (Arigita *et al.*, 2010). Além disso, a ventilação favorece a absorção de nutrientes e garante maiores taxas de crescimento. Bellintani *et al.* (2007), trabalhando com a bromélia *Orthophytum mucugense*, encontraram maior taxa de sobrevivência após 100 dias do transplântio com plantas provenientes de tubos vedados com algodão, condição que permitia trocas gasosas, em relação às plantas dos tubos vedados hermeticamente com filme de PVC. A vantagem do selamento com algodão em relação ao método de fechamento tradicional demonstrou que as trocas gasosas entre o microambiente *in vitro* e o ambiente externo favoreceram o desenvolvimento de adaptações contra a perda de água por transpiração e, conseqüentemente, reduziram o estresse hídrico durante a fase de aclimatização. O aumento da taxa de sobrevivência de plantas cultivadas em tubos que permitem trocas gasosas também foi observado para explantes de *Phillyrea latifolia* após 14 dias do transplântio. Contrariamente, as plantas cultivadas em tubos vedados hermeticamente apresentaram elevado percentual de morte durante a aclimatização (Lucchesini & Mensuali-Sodi, 2004).

A presença de sacarose no meio de cultura altera consideravelmente a bioquímica, a fisiologia e a morfologia das plantas crescidas *in vitro*, sendo uma fonte de estresse abiótico para elas. As plantas provenientes da cultura de tecidos apresentam baixa capacidade fotossintética, um dos maiores problemas durante o processo de aclimatização, causada pela adição de sacarose ao meio de cultivo. Nesse sistema, denominado fotomixotrófico, as plantas utilizam majoritariamente a sacarose do meio de cultura como fonte de carbono, mas ao realizarem fotossíntese, suprem parte de suas necessidades fixando o CO₂ atmosférico. No sistema de cultivo fotoautotrófico, o meio de cultura não é suplementado com carboidratos, sendo a fotossíntese a única fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Badr *et al.*, 2011). Alguns trabalhos apontam benefícios da supressão ou redução da sacarose adicionada ao meio de cultura sobre diversos parâmetros do crescimento e desenvolvimento, como observado em culturas de banana (Nguyen & Kozai, 2001), cana-de-açúcar (Xiao *et al.*, 2003) e batata (Badr *et al.*, 2011), o que facilita o crescimento autotrófico das plantas (Rybczyński *et al.*, 2007).

Além da redução da umidade relativa do ar e da diminuição da concentração de sacarose no meio de cultura, através da manipulação de outras variáveis, como elevação da concentração de CO₂ e da irradiância, as plantas podem apresentar melhor desenvolvimento, adquirindo mais rapidamente o metabolismo autotrófico e evitando o aparecimento das anormalidades que limitam o sucesso da aclimatização (Carvalho & Amâncio, 2002; Zobayed *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2005; Pospíšilová *et al.*, 2007; Kozai, 2010; Xiao *et al.*, 2011).

Embora em seu estado fundamental o oxigênio molecular (O₂) seja relativamente não reativo, ele é capaz de dar origem a estados excitados reativos e letais, como os radicais livres e seus derivados, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs incluem o radical superóxido (O₂^{•-}), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]), que são formados por meio de reações de transferência de elétrons, além da forma fisiologicamente energizada do O₂, o oxigênio *singlet* (¹O₂), continuamente produzido pelo fotossistema II (PSII) durante a fotossíntese. Em conjunto, essas são as EROs mais importantes biologicamente (Scandalios, 1993; Apel & Hirt, 2004; Carvalho, 2008).

Nas plantas, processos metabólicos normais como a respiração e a fotossíntese geram EROs inevitável e continuamente, principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Apel & Hirt, 2004; Blokina & Fagerstedt, 2010). O O₂^{•-} é produzido comumente em cloroplastos iluminados pela transferência ocasional de um elétron de uma molécula de clorofila excitada ou de um componente do PSI sob condições de alta relação NADPH/NADP para o oxigênio molecular. Na presença de íons metálicos como o ferro, o O₂^{•-} e o H₂O₂ podem reagir entre si através de uma reação conhecida como “Haber-Weiss”, gerando o radical hidroxila (OH[•]), que é o mais potente oxidante conhecido (Bowler *et al.*, 1992; Smirnov, 1993). Esse radical livre ataca indiscriminada e rapidamente todas as macromoléculas, acarretando graves danos aos componentes celulares, lesões ao DNA e mutações, muitas vezes levando a danos metabólicos irreparáveis e à morte celular (Scandalios, 1993).

As EROs são extremamente ativas e citotóxicas para os organismos, podendo reagir com ácidos graxos insaturados e causar a peroxidação de lipídeos essenciais da membrana plasmática ou de organelas intracelulares. Danos peroxidativos à membrana plasmática podem levar ao extravasamento do conteúdo celular, à rápida desidratação e à morte celular. Os danos às membranas intracelulares podem afetar a atividade respiratória nas mitocôndrias, causar queda no conteúdo de pigmentos e perda da

capacidade de fixação de carbono nos cloroplastos. Além disso, pode haver degradação de proteínas, inativação enzimática e danos ao DNA (Scandalios, 1993; Cassells & Curry, 2001; Møller, 2001; Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004; Møller *et al.*, 2007; Bat'ková *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010).

Diversos fatores ambientais podem acarretar desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de desintoxicação, aumentando o acúmulo desses componentes e acarretando estresse oxidativo (Mittler, 2002; Miller *et al.*, 2010; Kibinza *et al.*, 2011). Dentre eles se destacam a alta intensidade luminosa, exposição à radiação UV, salinidade, herbicidas, estresse hídrico, poluição do ar, altas ou baixas temperaturas, estresse mecânico e cultivo *in vitro* (Scandalios, 1993; Van Huylenbroeck *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Apel & Hirt, 2004; Agarwal & Shaheen, 2007; Zhang *et al.*, 2010). Ao longo dos anos, uma vasta literatura tem sido produzida acerca das respostas adaptativas das plantas aos estresses hídrico e osmótico, abrangendo as modificações anatômicas, fisiológicas e moleculares, bem como a regulação da expressão gênica desses processos (Bray, 1993; 1997; Smirnov, 1993; Ingram & Bartels, 1996; Chaves *et al.*, 2003; 2009; Reddy *et al.*, 2004; Mahajan & Tuteja, 2005; Valliyodan & Nguyen, 2006; Carvalho, 2008).

O estresse hídrico exerce influência direta sobre muitos processos bioquímicos e fisiológicos das plantas. Com a seca, ocorre redução do teor relativo de água e do potencial hídrico foliares, fechamento progressivo dos estômatos e redução das taxas de transpiração e de assimilação de CO₂, diminuição no volume dos cloroplastos e consequente acidificação do estroma, redução nos conteúdos e atividades de enzimas fotossintéticas do ciclo de redução do carbono, incluindo a enzima-chave ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), redução das taxas de fotossíntese líquida e da taxa de crescimento, havendo também a geração de EROs. Todo esse quadro faz do estresse hídrico um dos fatores mais adversos ao crescimento e à produtividade das plantas (Reddy *et al.*, 2004; Mahajan & Tuteja, 2005; Trovato *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2009; Ishibashi *et al.*, 2011).

Com o objetivo de neutralizar os danos causados pelo estresse hídrico, vários processos fisiológicos e bioquímicos são ativados, dentre eles a produção ou o acúmulo de solutos compatíveis (Molinari *et al.*, 2007), substâncias que podem acumular em altas concentrações no citoplasma celular sem interferir na estrutura ou no metabolismo da célula (Hoekstra *et al.*, 2001; Mohammadkhani & Heidari, 2008), sendo também denominados osmólitos compatíveis ou osmoprotetores (Reddy *et al.*, 2004). Os solutos

orgânicos, como diversos aminoácidos e açúcares, por exemplo, são compatíveis com os processos celulares e acumulam-se em níveis elevados no citosol em resposta ao aumento da seca (Evers *et al.*, 2010). A produção e acúmulo de osmólitos é uma estratégia utilizada para estabilizar as membranas e manter a conformação das proteínas em condições de baixo potencial hídrico foliar (Reddy *et al.*, 2004).

O aminoácido prolina é um dos osmoprotetores mais amplamente acumulados (Molinari *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2011), sendo considerado o principal soluto compatível em *Arabidopsis* (Xiong & Zhu, 2002). O acúmulo de prolina livre é de fundamental importância para a adaptação e tolerância de uma grande variedade de plantas a diferentes condições de estresse (Kavi Kishor *et al.*, 1995), como falta de água, salinização, altas ou baixas temperaturas, presença de metais pesados, infecção por patógenos, anaerobiose, deficiência de nutrientes, poluição atmosférica e exposição à radiação UV (Hare & Cress, 1997). Nessas condições, a prolina pode atuar como mediadora do ajustamento osmótico, estabilizadora de estruturas subcelulares, como membranas e proteínas, varredora de radicais livres e tampão redox, bem como um dos principais constituintes de proteínas da parede celular (Hare & Cress, 1997; Nanjo *et al.*, 1999; Hoekstra *et al.*, 2001; Molinari *et al.*, 2004; 2007; Reddy *et al.*, 2004; Verslues & Sharma, 2010; Sharma *et al.*, 2011).

Além do efeito adaptativo direto do acúmulo de prolina na neutralização das consequências dos estresses hídrico e osmótico, os processos de síntese e degradação desse aminoácido têm grande influência sobre o metabolismo celular. A falta de água causa aumento na relação NAD(P)H/NAD(P)^+ intracelular, a principal medida do estado redox das células, tendo como consequência o decréscimo no conteúdo de ATP. A síntese de prolina é acompanhada pela oxidação do NADH e regeneração do NADP^+ , uma vez que a prolina atua como molécula de transporte redox. O aumento da taxa de biossíntese da prolina nos cloroplastos durante o estresse pode manter uma baixa razão NADPH/NADP^+ , contribuindo para sustentar o fluxo de elétrons entre os centros de excitação fotossintética, estabilizando o equilíbrio redox e reduzindo a fotoinibição e os danos ao aparelho fotossintético, mantendo o metabolismo celular próximo da normalidade (Hare & Cress, 1997; Verbruggen & Hermans, 2008; Szabados & Savaure, 2009; Verslues & Sharma, 2010; Sharma *et al.*, 2011). Após o alívio do estresse, o rápido catabolismo da prolina gera equivalentes redutores que suportam a fosforilação oxidativa mitocondrial, fornecendo energia para a célula durante a recuperação das

plantas ao estresse (Hare & Cress, 1997; Trovato *et al.*, 2008; Szabados & Savouré, 2009).

Além disso, a atuação da prolina como substrato respiratório especializado tem sido demonstrada em alguns sistemas biológicos (Verslues & Sharma, 2010), o que se justifica pelo seu alto conteúdo energético (30 ATPs por molécula) (Atkinson, 1977; Mattioli *et al.*, 2009). Recentemente, o acúmulo de prolina tem sido apontado como importante também nos processos de desenvolvimento e florescimento, e o papel desse aminoácido como metabólito e como molécula sinalizadora tem ganhado destaque (Mattioli *et al.*, 2009).

A produção de grandes quantidades de EROs é uma consequência inevitável da redução fotossintética do oxigênio, levando as plantas a desenvolverem estratégias eficientes para lidar com o acúmulo desses compostos potencialmente tóxicos, que são elementos integrais da fotossíntese aeróbia (Apel & Hirt, 2004). A desintoxicação das EROs é feita tanto por mecanismos de defesa não enzimáticos quanto por mecanismos enzimáticos (Kibinza *et al.*, 2011). Antioxidantes não enzimáticos incluem os principais tampões redox celulares, o ascorbato e a glutatona, assim como tocoferol, flavonoides, alcaloides e carotenoides (Apel & Hirt, 2004). Mecanismos de defesa enzimáticos incluem enzimas capazes de remover, neutralizar ou varrer radicais livres e seus intermediários, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO), ascorbato peroxidase (APX), glutatona peroxidase (GPX) e glutatona redutase (GR), agindo como um dos principais mecanismos de tolerância ao estresse oxidativo nas plantas (Scandalios, 1993; Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004; Batková *et al.*, 2008; Lokhande *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2010).

O fechamento estomático resultante de condições de estresse hídrico limita a disponibilidade de CO₂ para a assimilação fotossintética de carbono. Essa condição, associada à alta irradiação, leva à produção excessiva do radical superóxido (O₂^{•-}) nos cloroplastos, o que pode resultar em fotoinibição e em danos foto-oxidativos. Os radicais O₂^{•-} transformam-se espontaneamente em H₂O₂, porém a reação é muito mais efetiva se for catalisada pela superóxido dismutase (SOD). As SODs, independentemente de suas origens, são metalo-proteínas multiméricas que agem como primeira linha de defesa contra EROs, transformando o íon superóxido em peróxido de hidrogênio (Alscher *et al.*, 2002; Grene, 2002; Gupta & Datta, 2003; Shao *et al.*, 2008). Diferentemente da maioria dos organismos, as plantas possuem múltiplos genes codificando SODs e diferentes isoformas (isozimas) são encontradas nos diversos

compartimentos celulares (cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos), bem como no citosol e apoplasto (Scandalios, 1993; Apel & Hirt, 2004).

A atividade da SOD leva à produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dentre as EROs, o H_2O_2 é muitas vezes considerado o mais crítico, pois é estável em pH biológico, atravessa membranas e é capaz de causar danos celulares graves devido à capacidade de geração do radical hidroxila (OH^\bullet) (Bienert *et al.*, 2006), devendo, portanto, ser rapidamente eliminado do metabolismo (Foyer *et al.*, 1994). O peróxido de hidrogênio produzido é removido eficientemente por enzimas como a CAT e a POD (Scandalios, 1993; Wang *et al.*, 2009). A principal enzima varredora de H_2O_2 em plantas é a CAT, produzindo água e oxigênio molecular. Trata-se de uma homoproteína tetramérica, considerada a defesa enzimática primária das plantas contra desidratação e estresse osmótico (Sreedhar *et al.*, 2009; Kibinza *et al.*, 2011). Apesar de também ser encontrada em glioxissomos e mitocôndrias (Zhang *et al.*, 2010), a CAT é localizada principalmente nos peroxissomos (Batková *et al.*, 2008).

A polifenol oxidase (PPO) é uma oxidase que contém cobre, catalisando a oxidação O_2 -dependente de catecóis em quinonas. Ela pode atuar sinergicamente com a POD, pois promove sua atividade através da geração de H_2O_2 a partir da oxidação de compostos fenólicos. Ambas têm ainda um papel importante na defesa das plantas pela oxidação de compostos fenólicos endógenos em quinonas, que são tóxicas para patógenos invasores e pragas (Krishna *et al.*, 2008).

O sucesso nos protocolos de micropropagação depende, em última análise, da sobrevivência das populações em condições de campo após a aclimatização. Sem um procedimento adequado de endurecimento não é possível levar plantas do laboratório para o solo e alcançar os benefícios esperados a partir do cultivo *in vitro*. Segundo Gour *et al.* (2007), um dos parâmetros mais eficientes para a determinação do estágio adequado do endurecimento das plantas durante a aclimatização é o conteúdo de clorofilas. Para esses autores, quando o conteúdo de clorofilas em plantas oriundas do cultivo *in vitro* alcança 95% dos valores encontrados em plantas mantidas em ambiente natural elas podem ser consideradas suficientemente endurecidas para sobreviverem em condições de campo. Jeon *et al.* (2006) observaram que o teor relativo de água reduziu em 50-70% do normal em plantas de uma espécie MAC dois dias após o transplante, sendo recuperado, entretanto, com o progresso da aclimatização. Esses autores verificaram, ainda, que o conteúdo de clorofilas aumentou com o incremento da umidade relativa embora a relação clorofila *a/b* não tenha sido alterada.

Outro grupo de moléculas acumuladas em resposta ao estresse hídrico, que contribui para a sobrevivência das plantas à dessecação, é o dos carboidratos (Seki *et al.*, 2007; Dinakar *et al.*, 2011). Seu metabolismo é tipicamente ajustado para proteger as plantas contra diversos tipos de estresse (Guy *et al.*, 2008) e diferentes carboidratos são sintetizados pelas plantas em resposta a essas condições, como os açúcares solúveis, por exemplo (Peterbauer & Richter, 2001; Mohammadkhani & Heidari, 2008). Em condições de desidratação severa, quando a água associada às macromoléculas é removida, os açúcares podem substituir a água perdida. Nessas condições, há um controle externo da dinâmica das membranas pela interação com substâncias citoplasmáticas, como os açúcares na superfície da membrana, evidenciando a importância dos carboidratos na manutenção da integridade estrutural celular. Para as proteínas, os açúcares atuam como substitutos da água, satisfazendo as necessidades de ligações de hidrogênio de grupos polares na superfície das proteínas secas, impedindo a agregação e a desnaturação proteicas por manterem a conformação nativa e a atividade biológica das proteínas (Hoekstra *et al.*, 2001).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar as atividades de enzimas e de componentes não enzimáticos do metabolismo antioxidativo após o cultivo *in vitro* de plantas de *Pitcairnia encholirioides* em presença de diferentes concentrações de sacarose, reguladores de crescimento e sistemas de vedação, assim como após aclimatização e também em condições de desidratação e posterior reidratação, buscando otimizar as condições de cultivo e proporcionar ganhos fisiológicos para as plantas, aumentando, conseqüentemente, a produção em larga escala e contribuindo para conservação desse importante recurso vegetal ameaçado de extinção.

3 – Material e Métodos

3.1 – Material vegetal

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

As plantas foram cultivadas em tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro por 15 cm de altura, em meios de cultura contendo sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionados de ácido giberélico (GA₃) na concentração de 10 µM ou de ácido naftaleno acético (ANA) na concentração de 0,2 µM. Esses fitormônios e as respectivas concentrações foram utilizados devido ao fato de, nessas condições, as plantas terem apresentado desenvolvimento superior em estudos anteriores.

Além dos efeitos desses reguladores de crescimento, foram avaliados os efeitos de duas concentrações de sacarose, 15 ou 30 g L⁻¹, e de dois tipos de vedação dos tubos de ensaio. Foram utilizados dois tipos de tampas de polietileno autoclaváveis: um tipo que permitiu a ocorrência de trocas gasosas, que ocorreu através do espaço formado entre a tampa e o tubo de ensaio devido ao fato de a tampa apresentar ranhuras para a fixação, e outro tipo de tampa, que se ajustou perfeitamente ao tubo de ensaio, não formando espaços, sendo ainda envolvida com filme de PVC esticável, auto-aderente, de 15 µm de espessura (Vitaspenser, Goodyear®), vedando hermeticamente o tubo de ensaio e restringindo, dessa forma, a ventilação. Os tubos de ensaio contendo as plantas foram mantidos em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (26 °C ± 1 °C), fotoperíodo (16-8 h) e luminosidade (40 µmoles de fótons m⁻² s⁻¹) permanecendo nesse ambiente por 150 dias, quando as plantas foram submetidas a diferentes análises bioquímicas e transferidas para condições *ex vitro*.

Após a manutenção das plantas sob condições *in vitro* nos diferentes tratamentos, elas foram submetidas à aclimatização *ex vitro*, sendo retiradas dos tubos de ensaio e tendo suas raízes lavadas em água corrente, para eliminar quaisquer resíduos dos meios de cultura. As plantas foram então transferidas para bandejas de isopor

(*speedlins*) com 128 células, preenchidas com substrato Plantmax Hortaliças HT[®] (Eucatex) umedecido e cobertas com lâmina plástica transparente, sendo mantidas sob sombreamento e irrigação periódica. Após 35 dias nessa condição inicial 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.

As plantas após aclimatização, provenientes dos tratamentos: a) GA₃, com tampas vedadas com filme de PVC (com restrição da ventilação) e 30 g L⁻¹ de sacarose e b) ANA, com tampas vedadas com filme de PVC e 15 g L⁻¹ de sacarose, foram submetidas a um ensaio de tolerância à desidratação, permanecendo por 30, 42 ou 54 dias sem irrigação, além do grupo controle, que foi mantido sob regime normal de irrigação periódica em casa de vegetação. Posteriormente, esses mesmos tratamentos foram submetidos à reidratação, sendo mantidos sob irrigação periódica por nebulização automatizada, em casa de vegetação coberta com plástico e sombrite 75%, por 90 dias.

Aos 150 dias de cultivo *in vitro*, após 180 dias de permanência *ex vitro* em casa de vegetação e também após a realização dos experimentos de tolerância à desidratação e posterior reidratação, amostras das plantas de *P. encholirioides* foram submetidas a diferentes determinações bioquímicas.

As Tabelas 1 e 2 a seguir apresentam um resumo dos esquemas de montagem dos experimentos.

Tabela 1. Experimentos de cultivo *in vitro* e aclimatização *ex vitro* de *P. encholirioides*.

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

NV = tampas não vedadas com plástico filme de PVC; V = tampas vedadas com plástico filme de PVC

Tabela 2. Experimentos de desidratação e reidratação de *P. encholiroides**.

| Regulador de crescimento | Sacarose | Desidratação (dias) | Tratamento |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|
| GA ₃ (ácido giberélico) | 30 g L ⁻¹ | 0 | 1 |
| | | 30 | 2 |
| | | 42 | 3 |
| | | 54 | 4 |
| ANA (ácido naftaleno acético) | 15 g L ⁻¹ | 0 | 5 |
| | | 30 | 6 |
| | | 42 | 7 |
| | | 54 | 8 |

*Reidratação: após desidratação, as plantas foram mantidas por 90 dias sob irrigação periódica.

2.2 – Análises bioquímicas

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

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

enzimas CAT, POD, PPO e SOD; 2) Ácido sulfosalicílico 3% (p/v), para o conteúdo de prolina (Bates *et al.*, 1973) e 3) Acetona 80% (v/v), para os conteúdos de pigmentos fotossintéticos (Lichtenthaler, 1987).

2.2.2 – Determinação do conteúdo de prolina

Para a determinação do conteúdo de prolina, procedeu-se da seguinte forma: em cada repetição dos tratamentos, foi adicionado 2 mL do filtrado + 2 mL de ninhidrina ácida (preparada com 250 mL de uma solução composta por 150 mL de ácido acético, 100 mL de ácido fosfórico 6 M e 6,25 g de ninhidrina (v/v/p)) + 2 mL de ácido acético. A mistura foi, então, incubada durante uma hora a 100 °C. Em seguida, o material foi transferido para banho de gelo. O cromóforo proveniente da reação foi extraído com tolueno, sendo este aspirado da fase aquosa superior após agitação em vórtex e separação das fases. Em seguida a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 520 nm, sendo o conteúdo de prolina determinado por intermédio de uma curva de calibração, utilizando-se solução de prolina 1 mM como padrão (Bates *et al.*, 1973).

2.2.3 – Determinação de proteínas totais

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Lowry *et al.* (1951) modificado. Os reagentes utilizados foram: **A**, constituído de 0,5% (p/v) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1% (p/v) de citrato de sódio e **B**: composto de 2% (p/v) de Na_2CO_3 em NaOH 0,1 N. O reagente **C** foi preparado pela mistura da proporção de 50:1 (v/v) dos reagentes **B** e **A**, respectivamente. O reagente **D** foi constituído do reagente fenol Folin-Ciocalteau, diluído a 50% (v/v) em água destilada.

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

utilizando ASB (albumina de soro bovino) 1 mg/mL como padrão. Posteriormente, o teor de proteínas foi utilizado para os cálculos das atividades específicas das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO).

2.2.4 – Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD nos tecidos foi determinada pela metodologia proposta por Del Longo *et al.* (1993). À mistura de reação constituída de metionina 13 mM, azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) 75 μ M, EDTA 100 nM e riboflavina 2 μ M, em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, adicionou-se 100 μ L do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25 °C numa câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente e, após 4 minutos, interrompida pelo desligamento da mesma (Giannopolitis & Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pela determinação do incremento na absorbância a 560 nm, subtraído do controle, no qual a mistura de reação foi mantida no escuro. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

2.2.5 – Determinação da atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

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

2.2.6 – Determinação da atividade das enzimas peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) e polifenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1, EC 1.10.3.2 e EC 1.14.18.1)

As atividades da POD e da PPO foram determinadas pelo método de Kar & Mishra (1976). Alíquotas de 100 µL do extrato enzimático bruto foram adicionadas a 4,9 mL de uma mistura de reação contendo: tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 + pirogalol 20 mM + H₂O₂ 20 mM (excluído do meio de incubação da PPO, no qual utilizou-se água destilada). Após incubação da solução por um minuto a 25°C, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de H₂SO₄ 5% (v/v) e a absorbância da solução, então, lida em espectrofotômetro a 420 nm, contra o controle, no qual a enzima foi previamente inativada pela adição de 0,5 mL de H₂SO₄ 5% (v/v). As atividades da POD e da PPO foram determinadas pela medição da quantidade de purpurogalina formada, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955).

2.2.7 – Composição de pigmentos fotossintéticos

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

2.2.8 – Teores de carboidratos

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

a) Determinação do teor de sacarose

O teor de sacarose foi determinado pela metodologia de Van Handel (1968), modificada. Foram pesados 0,1 g de massa foliar fresca, homogeneizados em 4,5 mL da mistura MCA (metanol, clorofórmio e água; 12:5:3 v/v/v) e centrifugados a 3.500 g, por

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

b) Determinação do teor de carboidratos solúveis totais

O teor de carboidratos solúveis totais nos tecidos foi obtido pelo método de Dubois *et al.* (1956). Foram pesados 0,1 g de massa foliar fresca, colocados em tubos de ensaio de 15 mL e homogeneizados com 5 mL de água destilada e mantidos em banho-maria por 30 minutos a 100 °C. Os tubos de ensaio foram retirados do banho-maria e levados para extração das amostras através da centrifugação a 190 g durante 10 minutos. Dos sobrenadantes coletados, retirou-se uma alíquota de 100 µL adicionada de 400 µL de H₂O destilada em tubos de ensaio, sendo submetidas à agitação vigorosa e homogeneização em vórtex. Depois, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% (p/v) e novamente agitados em vórtex. Posteriormente, foi adicionado uniformemente, de uma única vez, no centro de cada tubo, 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Em seguida, os tubos foram agitados novamente e colocados na bancada para repouso por 20 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 490 nm, tendo como controle água destilada (em substituição ao extrato) + reagentes adicionados na proporção de 0,5 mL de água destilada, 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄. Para o cálculo do teor de carboidratos solúveis totais utilizou-se uma curva-padrão de glicose e os resultados foram expressos em mg de glicose g⁻¹ de MF.

c) Determinação do teor de amido

Para a determinação do teor de amido nos tecidos o método utilizado foi o de Dubois *et al.* (1956). Foi realizada uma extração etanólica de 0,1 g de massa foliar fresca em 5,0 mL de etanol 80% (v/v) por 30 minutos a 80 °C e depois uma nova extração com 5,0 mL de ácido perclórico (HClO₄) 30% (v/v) por 30 minutos a 25 °C. A primeira e a segunda extração foram combinadas e centrifugadas a 760 g por 10 minutos e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes de cada extração foram unidos e o volume aferido para 10 mL com água destilada para obtenção do extrato total. Nos tubos de ensaio foram colocados 100 µL do sobrenadante e 400 µL de H₂O destilada e, então, submetidos à agitação em vórtex. Após esse procedimento, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e nova agitação em vórtex foi realizada. Logo após, foi adicionado uniformemente no centro de cada tubo 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e mais uma vez os tubos foram agitados em vórtex. A leitura foi realizada após 20 minutos de repouso em espectrofotômetro ajustado a 490 nm. Para o cálculo do teor de amido utilizou-se uma curva-padrão de glicose sendo os resultados expressos em mg de glicose g⁻¹ de MF.

d) Determinação do teor de açúcares redutores

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

2.3 – Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos envolvendo cada um dos diferentes meios de cultura contendo GA₃ ou ANA foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com nove repetições, no esquema experimental fatorial 2 x 2 (concentração de sacarose 15 g x concentração de sacarose 30 g; tampas não vedadas x tampas vedadas com plástico filme de PVC), totalizando 4 tratamentos para cada regulador de crescimento. Nos experimentos de tolerância à desidratação e de reidratação foram testados dois

tratamentos, variando-se a origem das plantas em função da concentração de sacarose, 15 ou 30 g L⁻¹ e do regulador de crescimento utilizado durante o cultivo *in vitro*.

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

3 – Resultados

As plantas de *P. encholirioides* (Figura 1) apresentaram bom desenvolvimento vegetativo após aclimatização *ex vitro*. Sob condições de cultivo *in vitro*, houve melhor desenvolvimento e crescimento das plantas nos tratamentos contendo ANA, nos tubos não vedados com filme de PVC, correspondentes aos tratamentos 5 e 7 (Figura 2). Durante a aclimatização, visualmente, todas as plantas apresentaram desenvolvimento similar.



Figura 1. Hábito de crescimento vegetativo de plantas de *Pitcairnia encholirioides* aclimatizadas em casa de vegetação

Durante o período de permanência *in vitro* foram observadas perdas elevadas devido à senescência das plantas. O percentual de mortalidade das plantas após 150 dias de cultivo *in vitro* é apresentado na Figura 3. Durante a aclimatização em casa de vegetação as perdas foram significativamente menores, com média de 11,3%, variando entre 2,5% e 34,8% (Figura 4).

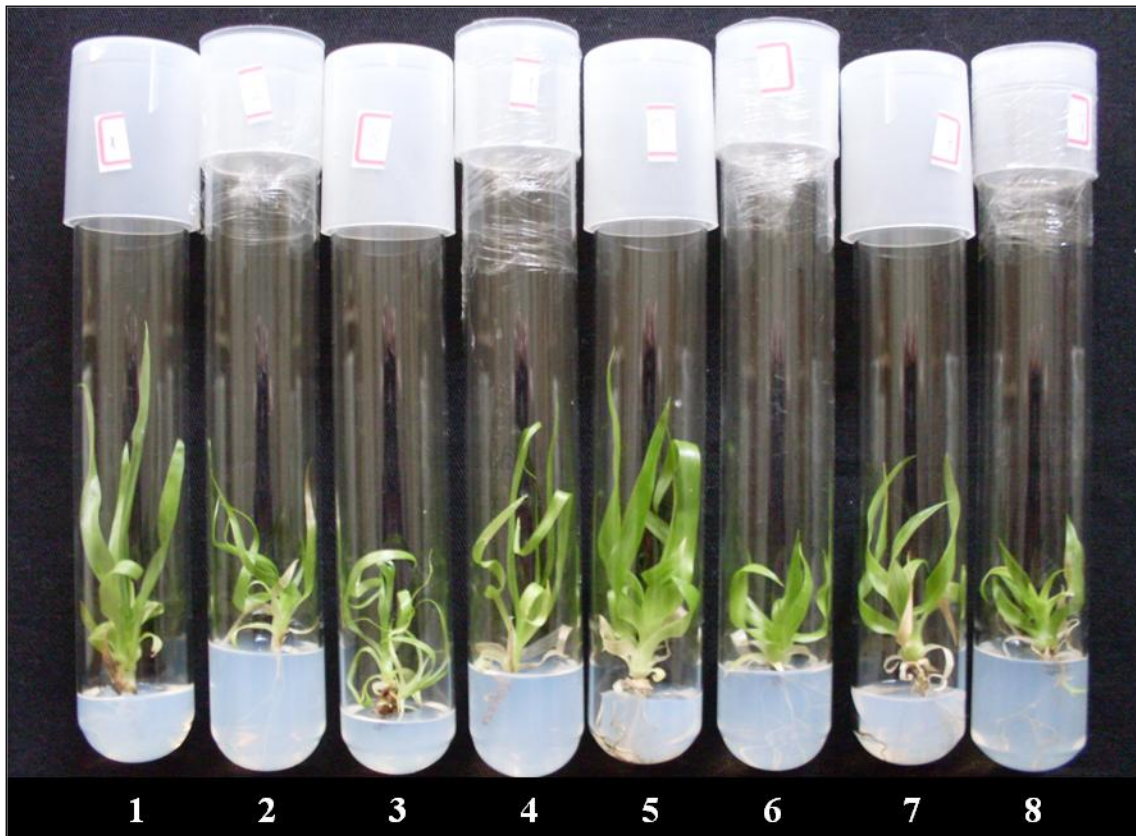


Figura 2. Plantas de *Pitcairnia encholirioides* obtidas após 150 dias de cultivo *in vitro* em meio com diferentes reguladores de crescimento, concentrações de sacarose e tipos de vedação dos tubos de ensaio. Tratamentos: **1)** 10 μM GA₃, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas não vedadas; **2)** 10 μM GA₃, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas; **3)** 10 μM GA₃, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas não vedadas; **4)** 10 μM GA₃, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas; **5)** 0,2 μM ANA, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas não vedadas; **6)** 0,2 μM ANA, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas; **7)** 0,2 μM ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas não vedadas e **8)** 0,2 μM ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas.

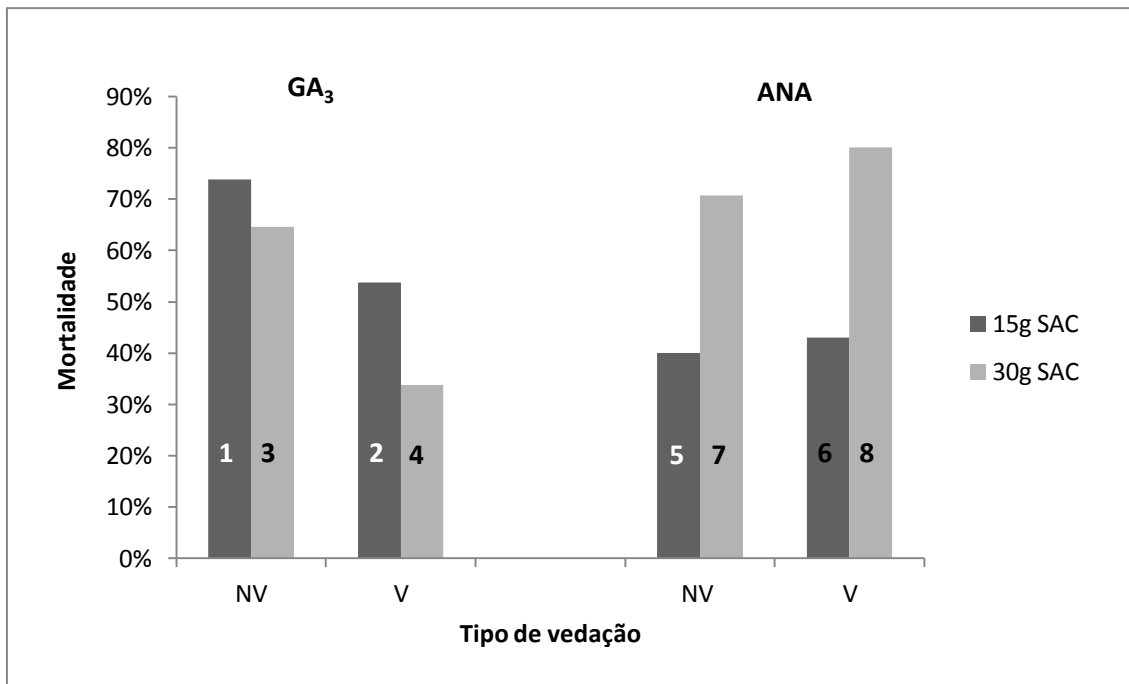


Figura 3. Percentual total de mortalidade de plantas de *Pitcairnia encholirioides* após 150 dias de cultivo *in vitro* na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado – NV ou vedado – V).

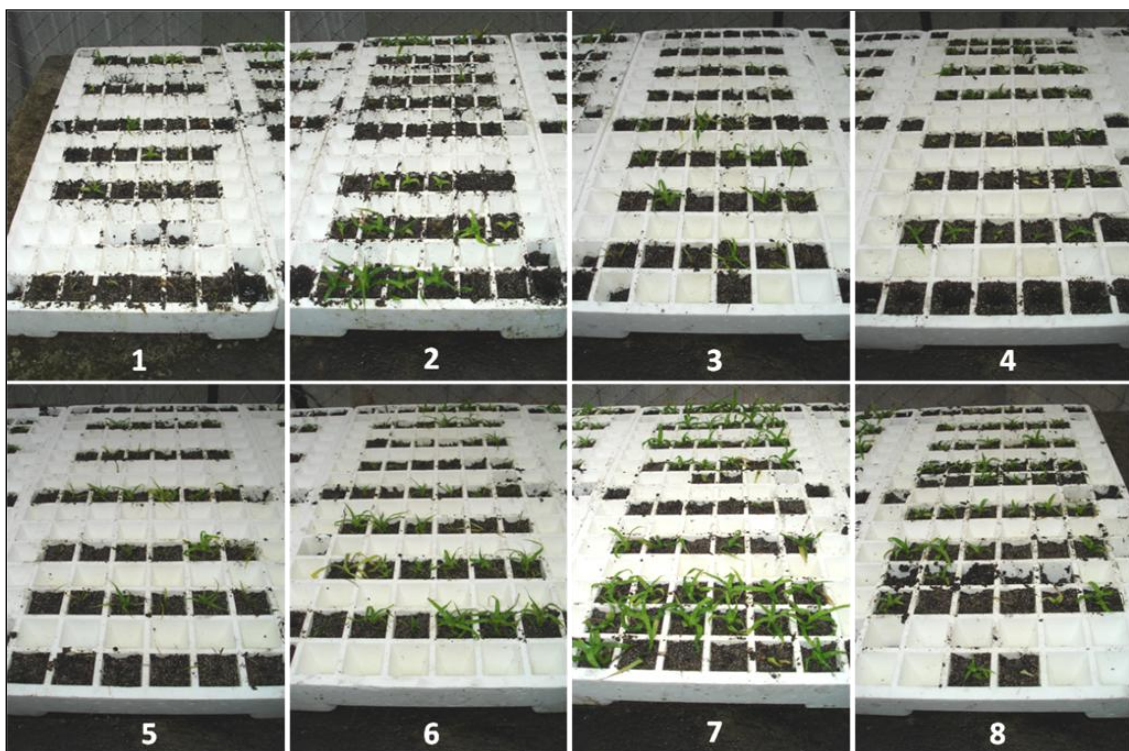


Figura 4. Plantas de *Pitcairnia encholirioides* em casa de vegetação após 50 dias do início da aclimatização *ex vitro*. Os tratamentos de origem foram: **1)** 10 μM GA₃, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas não vedadas; **2)** 10 μM GA₃, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas; **3)** 10 μM GA₃, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas não vedadas; **4)** 10 μM GA₃, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas; **5)** 0,2 μM ANA, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas não vedadas; **6)** 0,2 μM ANA, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas; **7)** 0,2 μM ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas não vedadas e **8)** 0,2 μM ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas.

3.1 – Análises bioquímicas das plantas mantidas *in vitro* e após aclimatização *ex vitro* em casa de vegetação

3.1.1 – Prolina

Nos tecidos provenientes de plantas mantidas *in vitro*, os teores de prolina apresentaram comportamentos distintos em resposta aos reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultura. Para GA₃, não foram encontradas diferenças significativas entre as duas concentrações de sacarose, independentemente do tipo de vedação utilizada, embora os valores tenham sido menores nos meios de cultura adicionados de 30 g L⁻¹ (Figura 5). Em relação à auxina, diferenças significativas foram encontradas, com maiores teores de prolina sendo observados em tecidos cultivados na maior concentração de sacarose. Nas plantas mantidas em tubos de ensaio hermeticamente vedados, houve maior acúmulo de prolina, aproximadamente 32%, no meio com 30 g L⁻¹ de sacarose em relação ao meio de cultura contendo a menor concentração desse carboidrato. Nos tecidos provenientes de tubos não vedados os teores de prolina foram 16% maiores no meio adicionado da maior concentração de sacarose.

Comparando-se os efeitos do tipo de vedação dos tubos de ensaio, percebeu-se uma redução significativa nos teores de prolina nas plantas mantidas em tubos hermeticamente vedados, em comparação aos não vedados, apenas nos meios de cultura em que GA₃ foi adicionado. Na menor concentração de sacarose, o conteúdo de prolina foi 15% menor e na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose, 17,8% menor. Na presença de ANA, não foram encontradas diferenças entre os teores de prolina nos tecidos das plantas mantidas em tubos não vedados e vedados, em meio suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, embora os valores encontrados tenham sido maiores nos materiais provenientes de tubos hermeticamente vedados. Na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose, o teor de prolina foi aproximadamente 24,1% maior nos tecidos provenientes de tubos vedados em comparação aos não vedados, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

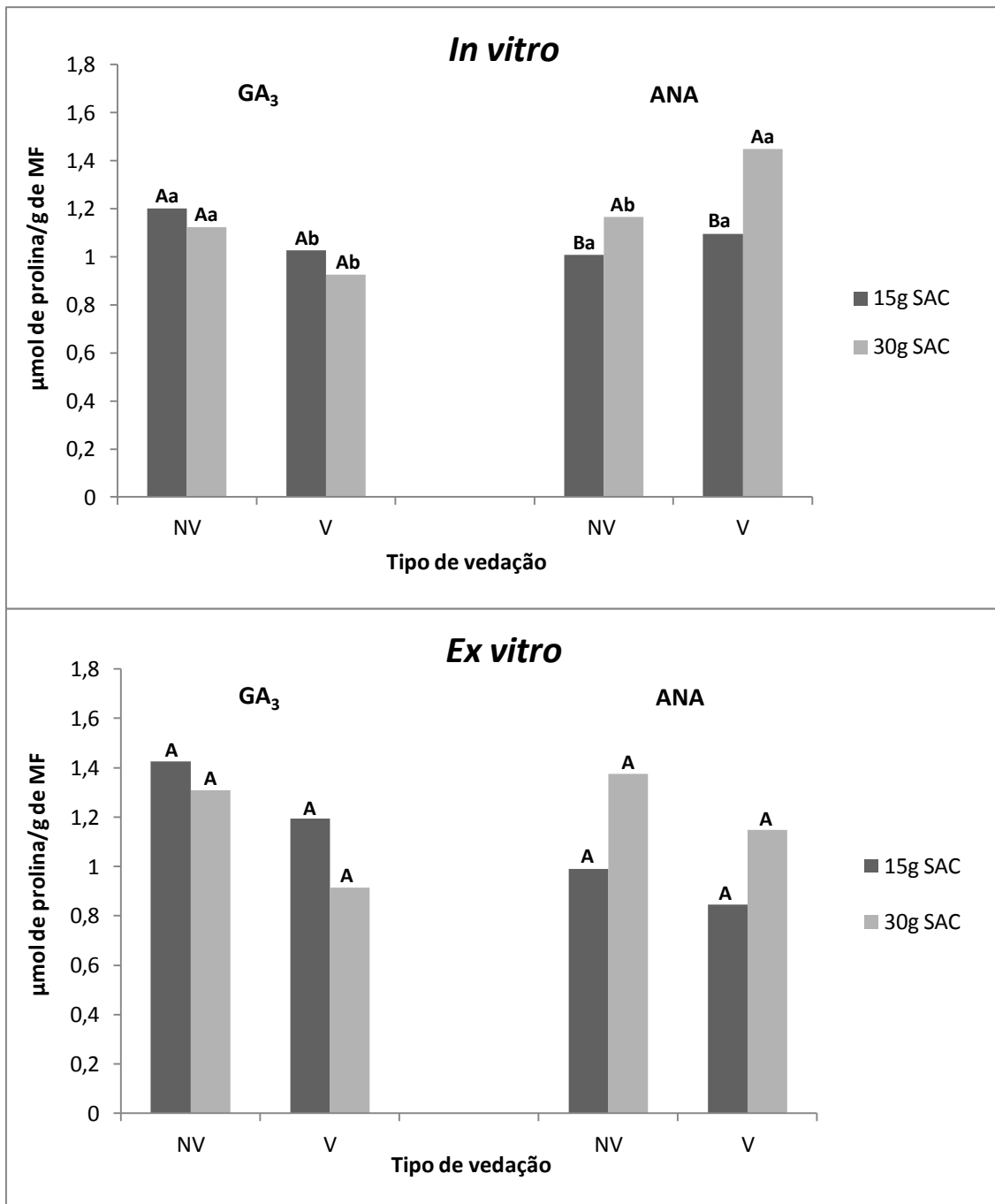


Figura 5. Teores de prolina em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV e V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Resultados ligeiramente diferentes foram encontrados nos materiais aclimatizados. Independentemente do regulador de crescimento adicionado, não foram

encontradas diferenças significativas no conteúdo de prolina entre as plantas cultivadas previamente em meios de cultura contendo as duas concentrações de sacarose utilizadas, embora os resultados tenham sido menores na maior concentração de sacarose para GA₃ e para ANA tenha ocorrido exatamente o contrário.

3.1.2 – Proteínas totais

Na primeira análise, realizada após o período de 150 dias de permanência das plantas *in vitro*, os teores de proteínas totais foram maiores nos tecidos provenientes de plantas cultivadas na maior concentração de sacarose (30 g L⁻¹), embora tenha havido diferenças significativas somente nos materiais mantidos em tubos vedados, independentemente dos reguladores de crescimento utilizados (Figura 6). Nos materiais mantidos em tubos de ensaio não vedados, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os conteúdos de proteínas totais nos tecidos cultivados nas diferentes concentrações de sacarose.

Com relação ao tipo de vedação utilizado, o teor de proteínas totais foi significativamente menor nos tecidos mantidos em tubos vedados, em comparação com os não vedados, independentemente do regulador de crescimento e da concentração de sacarose utilizada. As maiores diferenças ocorreram nos materiais provenientes dos meios de cultura contendo ANA, com valores 25,4 e 47,6% menores, respectivamente, para a maior e a menor concentração de sacarose.

Na análise realizada após um período de 180 dias de aclimatização *ex vitro*, os resultados encontrados foram diferentes dos obtidos nos materiais mantidos *in vitro*. Maiores teores de proteínas totais foram encontrados nas plantas provenientes dos meios adicionados de 15 g L⁻¹ de sacarose, em presença de GA₃. Embora os resultados não tenham sido estatisticamente diferentes, nas plantas provenientes de meios de cultura contendo ANA observou-se o contrário, com maior acúmulo de proteínas em resposta à maior concentração de sacarose.

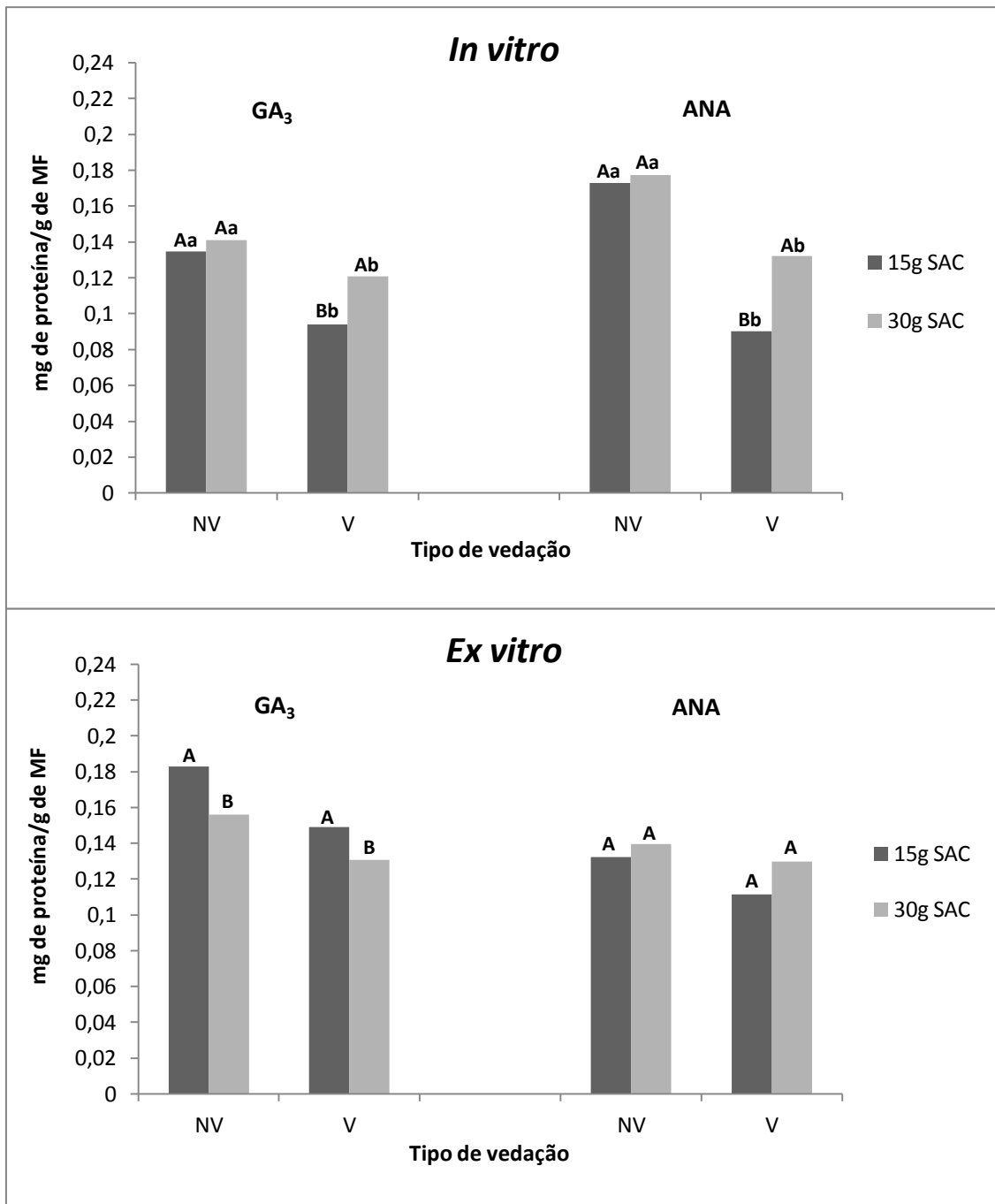


Figura 6. Teores de proteínas totais em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV ou V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em comparação ao material mantido *in vitro*, exceto para os materiais provenientes dos tratamentos que utilizaram tampas não vedadas e ANA, todos os

demais apresentaram tendência de aumento no teor de proteínas após o período de aclimatização *ex vitro*.

3.1.3 – Enzimas do metabolismo antioxidativo (superóxido dismutase, catalase, peroxidase e polifenol oxidase)

a) Superóxido dismutase (SOD)

No experimento realizado com as plantas mantidas *in vitro*, a atividade da SOD foi significativamente menor nos tecidos provenientes de meios de cultura contendo a maior concentração de sacarose, independentemente do regulador de crescimento e do tipo de vedação utilizados (Figura 7). As maiores diferenças na atividade enzimática ocorreram nos materiais oriundos de frascos contendo GA₃ e não vedados hermeticamente, e nos materiais contendo ANA e hermeticamente vedados, sendo aproximadamente 37,8% menor em ambos os tratamentos. Diferenças significativas entre materiais provenientes de tubos não vedados e hermeticamente vedados foram encontradas somente em tecidos mantidos em meio contendo GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose e também em meio contendo ANA e 15 g L⁻¹ de sacarose, com maiores atividades da SOD nas plantas oriundas dos tubos vedados, com valores, em média, 36,8% maiores.

Embora a atividade da SOD tenha sido maior nos meios com 30 g L⁻¹ de sacarose, independentemente do regulador de crescimento e do tipo de vedação utilizados, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os resultados nas análises realizadas com tecidos de plantas aclimatizadas.

Para a SOD não se observou um padrão definido de aumento ou redução da atividade enzimática nos materiais aclimatizados, em comparação às plantas mantidas *in vitro*.

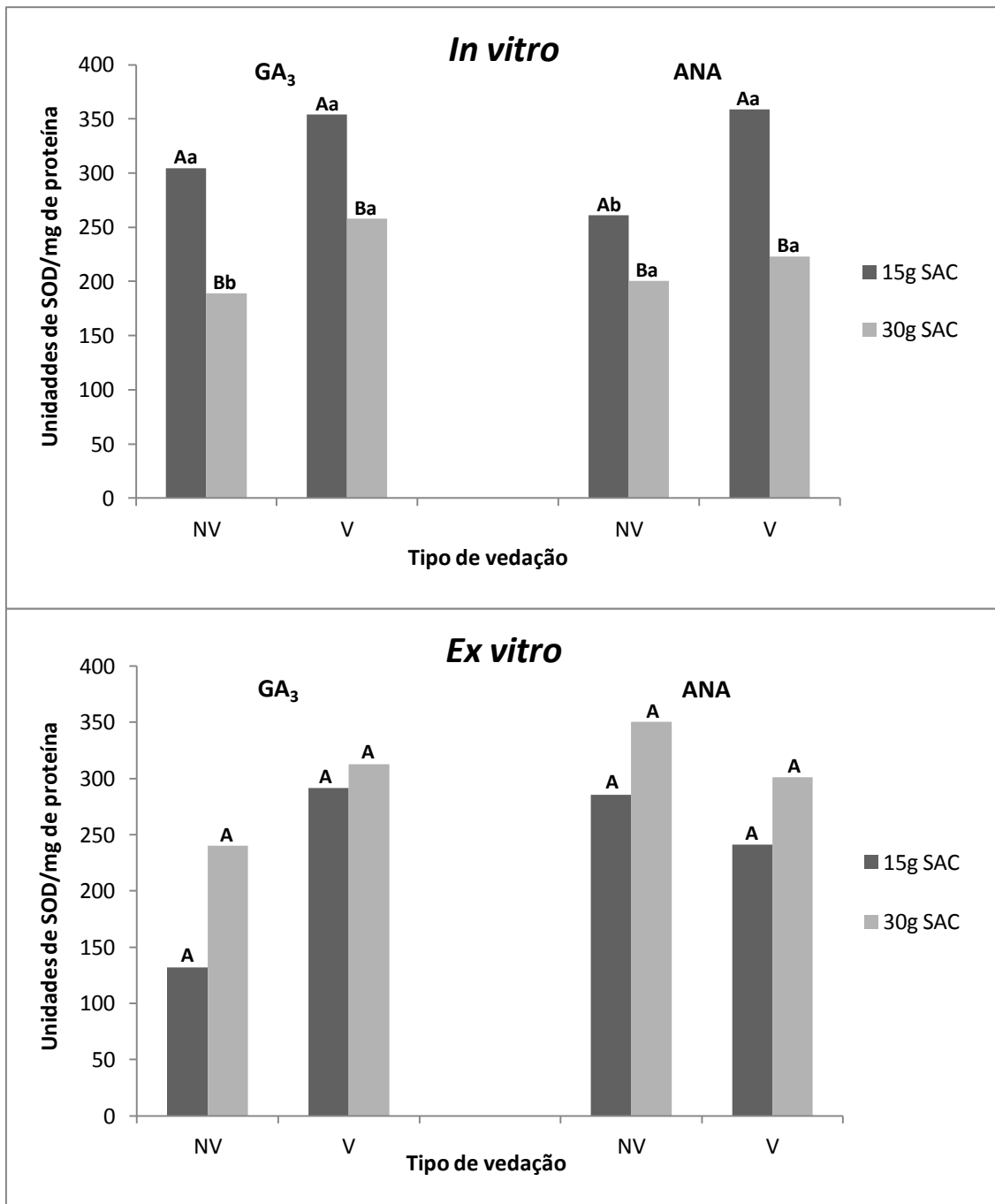


Figura 7. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV ou V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

b) Catalase (CAT)

Na análise realizada com as plantas mantidas *in vitro*, a atividade da catalase (CAT) foi significativamente menor nos tecidos provenientes de plantas cultivadas em meios de cultura adicionados de 30 g L⁻¹ de sacarose, independentemente do regulador de crescimento e do tipo de vedação utilizado (Figura 8). As maiores diferenças foram observadas nos tecidos mantidos em meio contendo ANA e nos tubos hermeticamente vedados, nos quais a atividade enzimática foi 29,3% menor nos materiais mantidos em meio com 30 g L⁻¹ de sacarose, em comparação aos materiais cultivados em meio adicionado de 15 g L⁻¹.

Para os materiais mantidos em meios em que o GA₃ foi adicionado, independentemente da concentração de sacarose utilizada, não foram encontradas diferenças significativas entre aqueles provenientes dos tubos não vedados e dos hermeticamente vedados. O mesmo não foi observado nos tecidos mantidos em meios contendo ANA, nos quais se verificou maior conteúdo de peróxido consumido nos tubos hermeticamente vedados, o que é indicativo da maior atividade da catalase, em comparação aos materiais mantidos em tubos que permitiam trocas gasosas, independentemente da concentração de sacarose adicionada aos meios de cultura.

Os resultados da análise realizada nos materiais aclimatizados *ex vitro* evidenciaram que em meio de cultura contendo ANA, independentemente do tipo de vedação, a atividade da CAT foi significativamente menor nos tecidos mantidos anteriormente em meios de cultivo com a maior concentração de sacarose, em relação aos tecidos cultivados *in vitro* com 15 g L⁻¹. Para os materiais oriundos dos tratamentos contendo GA₃, houve maior atividade enzimática nos tecidos cultivados na maior concentração de sacarose, embora resultados significativos tenham sido encontrados somente nos materiais vedados.

As atividades da catalase nos materiais aclimatizados foram sempre maiores do que as observadas nos materiais mantidos *in vitro*, com destaque para os cultivados em meios contendo GA₃, em tubos hermeticamente vedados e na maior concentração de sacarose, nos quais a atividade enzimática foi 213,4% maior.

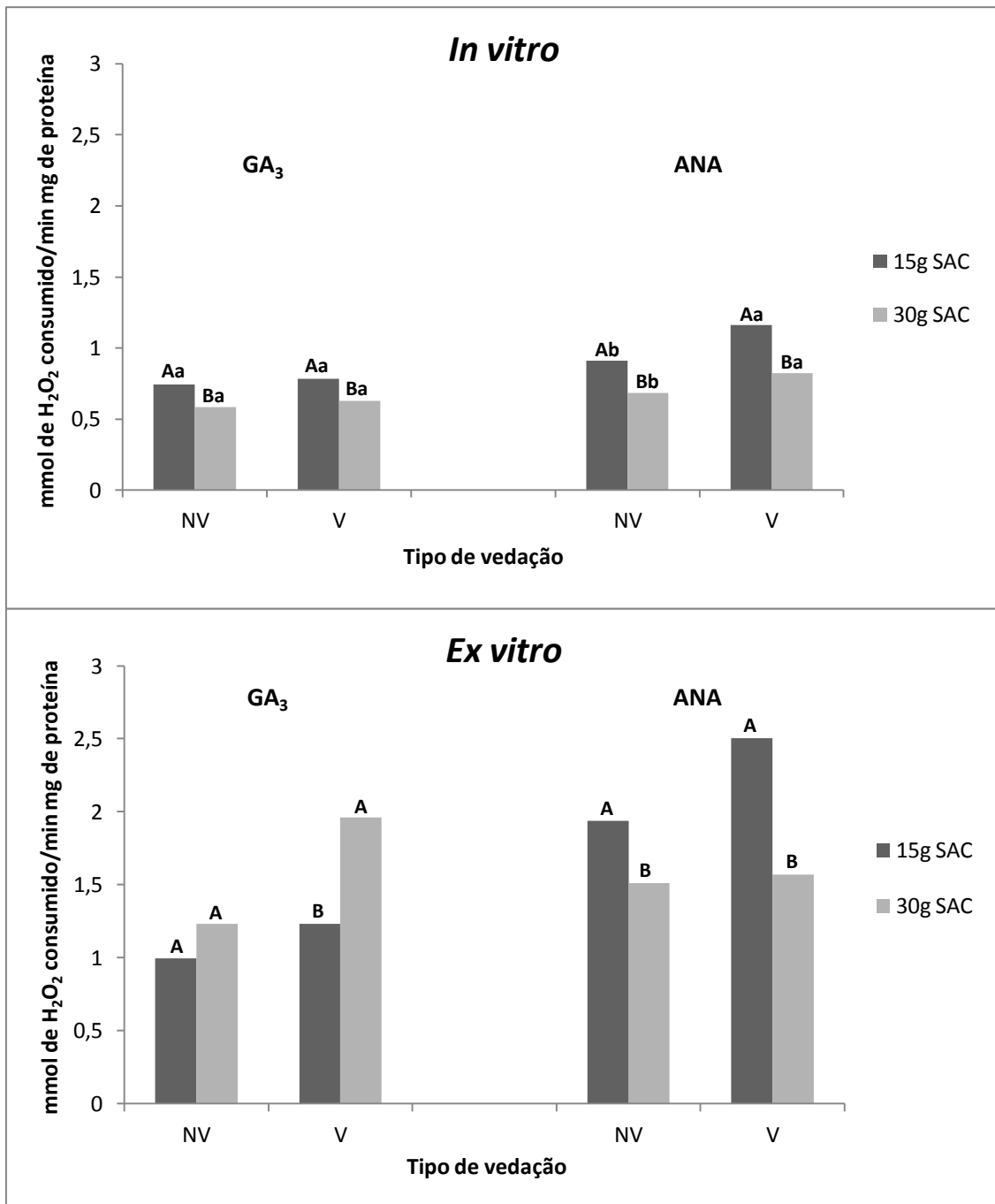


Figura 8. Atividade da enzima catalase (CAT) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV ou V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

c) Peroxidase (POD)

In vitro, a atividade da peroxidase (POD) foi maior nas plantas provenientes de tubos nos quais foram adicionados 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 9). Somente nos tratamentos contendo ANA e nos tubos vedados é que as diferenças nas atividades enzimáticas não foram significativas. De maneira geral, o tipo de vedação não influenciou a atividade da POD, sendo única exceção o tratamento contendo ANA, na maior concentração de sacarose, com atividade enzimática significativamente menor nos tubos vedados.

Nos materiais aclimatizados, o padrão observado para os dois reguladores de crescimento utilizados não foi o mesmo. Para GA₃, somente as plantas cultivadas anteriormente em tubos de ensaio não vedados apresentaram atividades enzimáticas significativamente maiores em presença de 30 g L⁻¹ de sacarose, aproximadamente 20%. Para ANA, no entanto, os valores da atividade da POD foram 34,3% menores nos tecidos cultivados previamente na maior concentração de sacarose.

Assim como observado para a CAT, a POD também apresentou maiores atividades nos materiais aclimatizados, com destaque para as plantas provenientes dos tratamentos nos quais o ANA foi adicionado *in vitro*.

d) Polifenol oxidase (PPO)

Na análise realizada com tecidos provenientes de plantas mantidas *in vitro*, a atividade da polifenol oxidase (PPO) apresentou resultados estatisticamente diferentes entre as duas concentrações de sacarose utilizadas somente nos materiais cultivados em meio contendo ANA, não sendo encontradas diferenças em meio contendo GA₃, independentemente do tipo de vedação utilizado (Figura 10). Porém, na comparação entre os dois tipos de vedação, considerando cada concentração de sacarose, a atividade enzimática foi sempre menor nos tecidos provenientes de tubos de ensaio vedados, em comparação aos não vedados. Já no material aclimatizado, houve menor atividade dessa enzima nos materiais provenientes dos tubos contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, independentemente do regulador de crescimento e do tipo de vedação utilizados. Porém, resultados significativos somente foram encontrados nos tecidos provenientes de plantas

mantidas anteriormente em tubos hermeticamente vedados e cultivadas *in vitro* na presença de ANA.

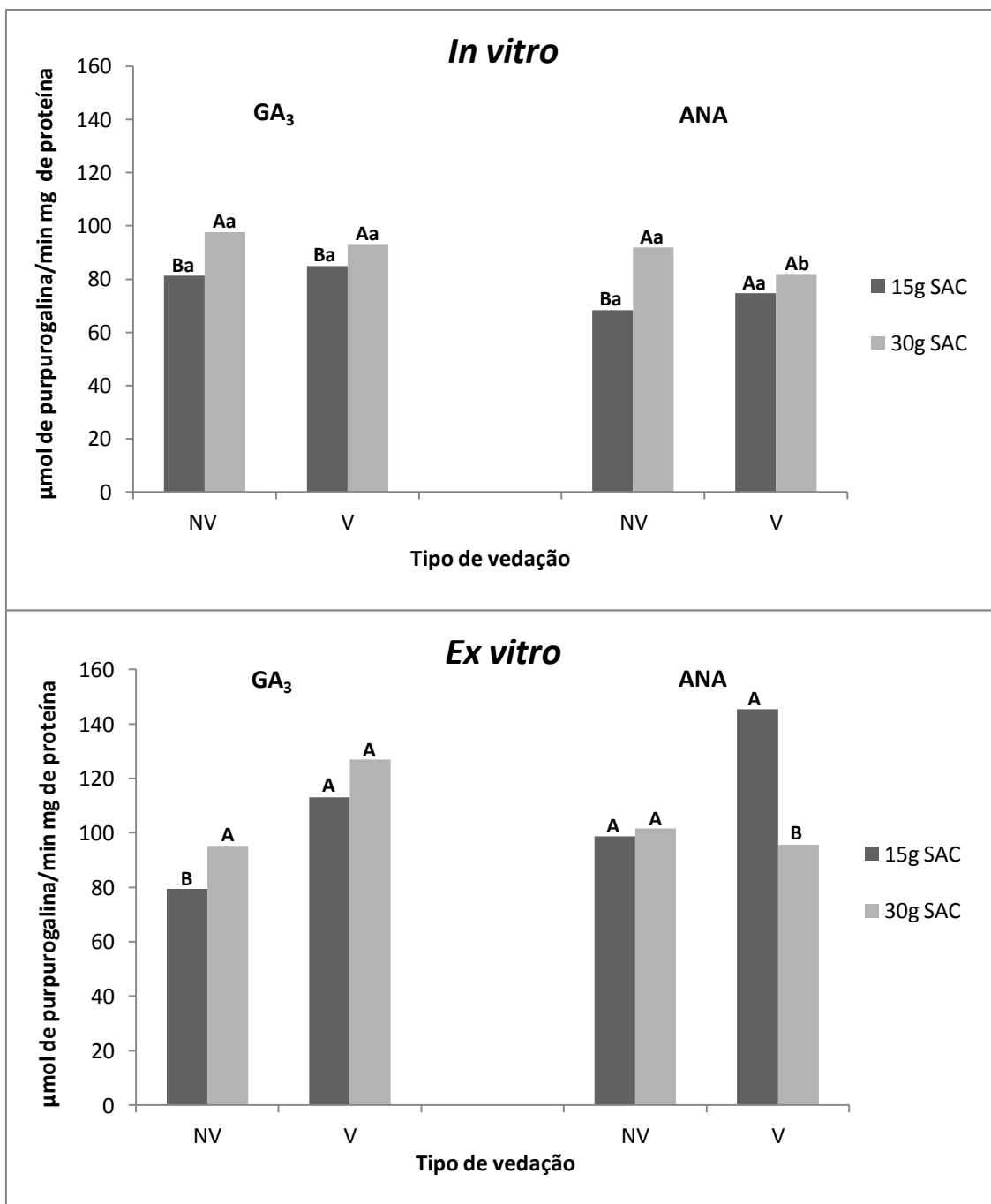


Figura 9. Atividade da enzima peroxidase (POD) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV ou V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

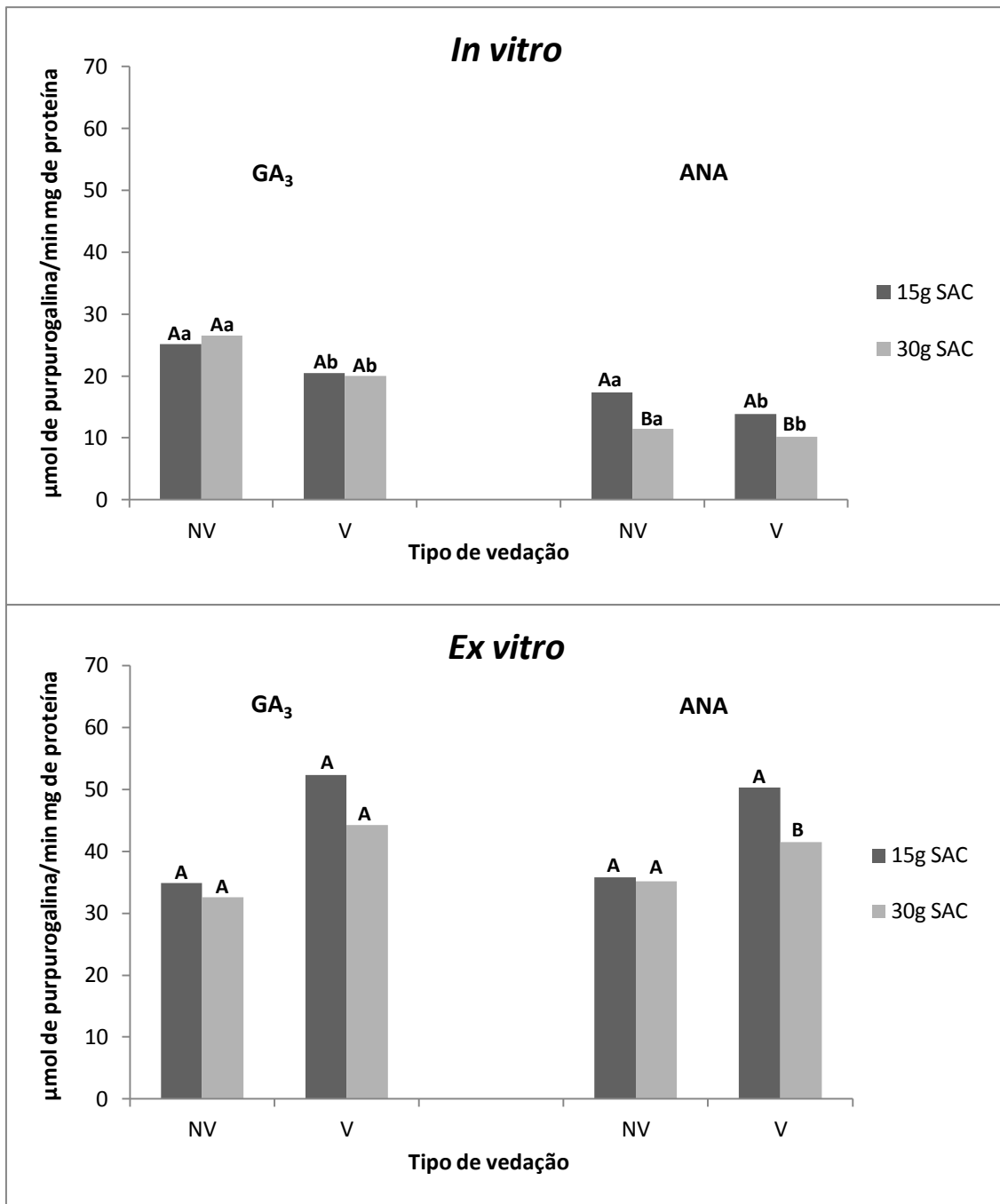


Figura 10. Atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV ou V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A atividade da PPO também foi maior nos tecidos das plantas aclimatizadas, em comparação aos tecidos provenientes de plantas mantidas *in vitro*. Vale ressaltar que as

maiores diferenças foram observadas nos materiais provenientes de meios suplementados com ANA, principalmente nos materiais oriundos de tubos hermeticamente vedados, com aumentos na atividade enzimática das plantas aclimatizadas em relação às plantas mantidas *in vitro*, de 264,5% e 310% para tecidos mantidos em meios contendo 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente.

3.1.4 – Pigmentos

a) Teores de clorofila *a* e clorofila *b*

Com relação aos teores de clorofilas acumuladas nos tecidos das plantas mantidas *in vitro*, comportamentos similares foram observados para as clorofilas *a* e *b* (Figura 11).

Foram encontrados maiores teores de clorofilas *a* e *b* nos tecidos provenientes dos tratamentos contendo a maior concentração de sacarose somente naqueles suplementados com GA₃, embora as diferenças tenham sido significativas somente nos tecidos provenientes dos tubos de ensaio que não permitiam trocas gasosas, com conteúdos 82% e 96% maiores de clorofila *a* e clorofila *b*, respectivamente.

Em contraste, nos meios contendo ANA, foram encontrados teores de clorofilas *a* e *b* significativamente menores nos tecidos provenientes dos meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, independentemente do tipo de vedação utilizado. As maiores diferenças para clorofila *a* ocorreram nos tecidos de plantas mantidas em tubos não vedados, e para clorofila *b* em tubos hermeticamente vedados, ambos com teores 40% menores em relação ao meio com a menor concentração de sacarose.

Considerando os efeitos do tipo de vedação, diferenças significativas foram observadas em resposta ao GA₃ somente em materiais provenientes de meios de cultura suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose para clorofila *a*, com valores 26,4% menores, e na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose para clorofila *b*, com valores 40% maiores, ambos em tecidos provenientes dos tubos fechados com tampas que impediam a realização de trocas gasosas. Por sua vez, para o ANA, resultados mais uniformes foram encontrados.

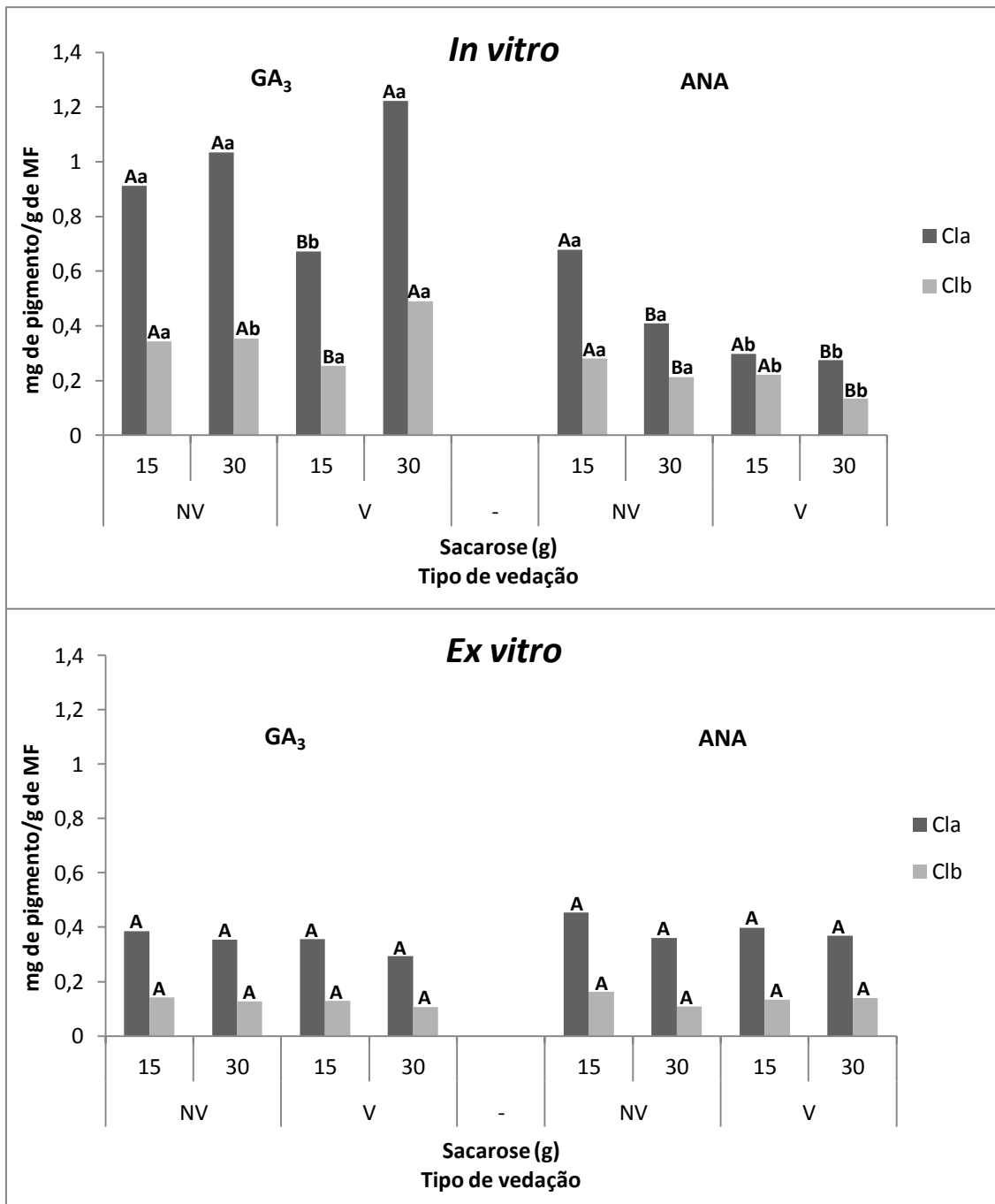


Figura 11. Teores de clorofila *a* (Cla) e clorofila *b* (Clb) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV ou V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os teores das clorofilas *a* e *b* foram significativamente menores nos materiais provenientes de tubos hermeticamente vedados, independentemente da concentração de

sacarose utilizada. Vale ressaltar que as maiores diferenças foram observadas em tecidos provenientes de frascos contendo 15 g L^{-1} de sacarose, para clorofila *a* (56,7% menor), e com 30 g L^{-1} de sacarose, para clorofila *b* (38% menor).

Na análise realizada com plantas aclimatizadas, os resultados não evidenciaram diferenças significativas entre os materiais, independentemente da concentração de sacarose, do tipo de vedação e do regulador de crescimento utilizados.

Apesar de não terem sido realizadas análises estatísticas comparando-se os materiais mantidos *in vitro* com os já aclimatizados, foi evidente a redução no conteúdo de clorofilas nos tecidos das plantas após a transferência para condições *ex vitro*, especialmente nos materiais provenientes de meios de cultura suplementados com GA_3 . Na presença de ANA, a tendência de redução foi menor, havendo, inclusive, aumentos nos teores de clorofila *a* nos materiais provenientes dos tubos vedados, independentemente da concentração de sacarose utilizada.

b) Teores de clorofilas totais e carotenoides totais

Os resultados encontrados para os teores de clorofilas e carotenoides totais foram bastante similares àqueles obtidos para as clorofilas *a* e *b*, com ligeiras diferenças. Tanto para clorofilas quanto para carotenoides totais, nos materiais mantidos em meio contendo GA_3 , teores significativamente maiores desses pigmentos foram observados somente nos tecidos provenientes de plantas mantidas em frascos hermeticamente vedados e na maior concentração de sacarose, quando comparado com tecidos cultivados em meios nos quais esse carboidrato foi adicionado a 15 g L^{-1} (Figura 12). Ainda na presença de GA_3 , comparando-se os efeitos do tipo de vedação, houve diferenças significativas somente nos materiais oriundos de meios adicionados de 15 g L^{-1} de sacarose, com valores 26,4 e 28,5% menores, respectivamente, nos teores de clorofilas e carotenoides totais.

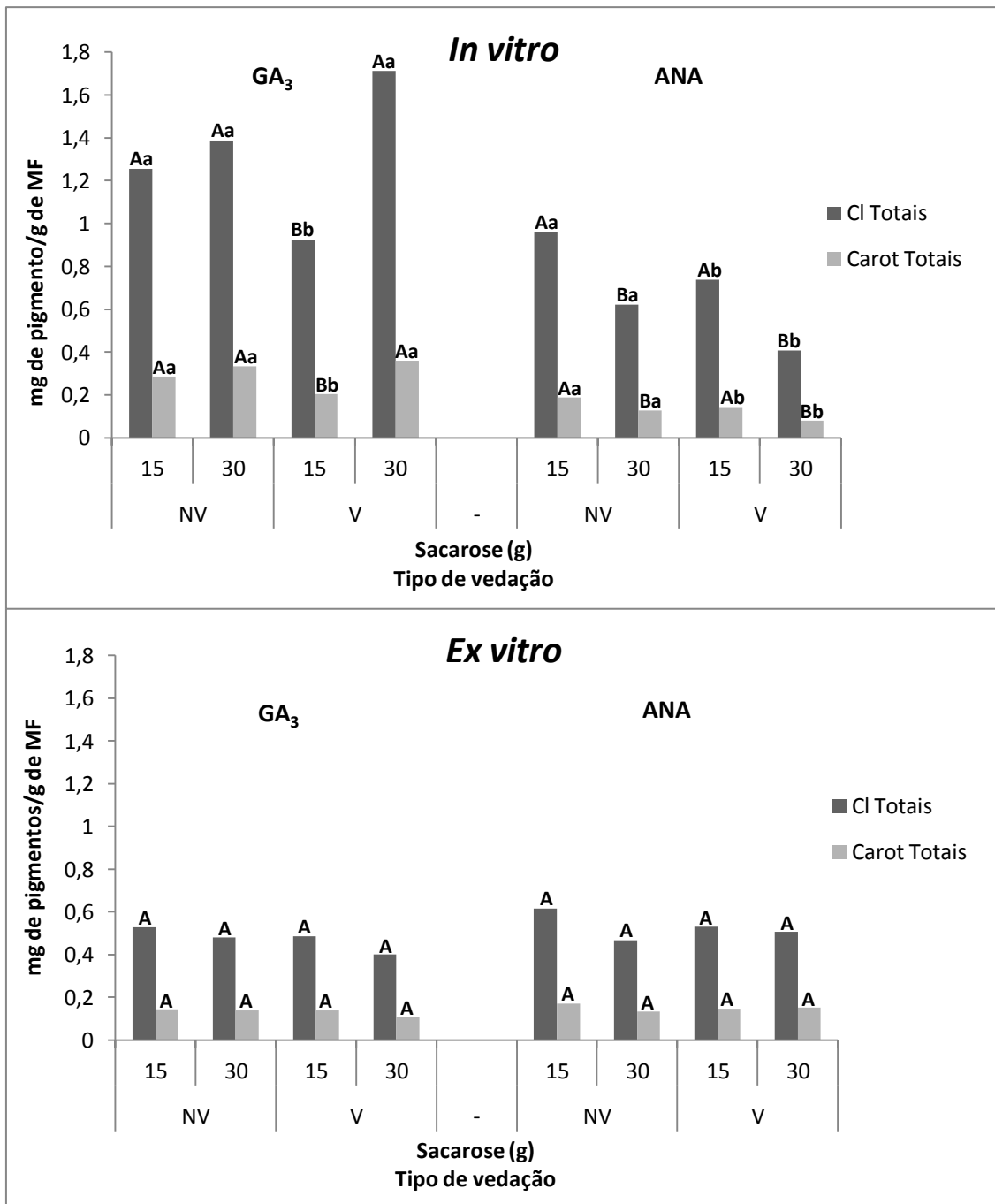


Figura 12. Teores de clorofilas (CI Totais) e carotenoides totais (Carot Totais) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV ou V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para o ANA, os efeitos das diferentes concentrações de sacarose e dos tipos de vedação foram similares aos observados para as clorofilas *a* e *b*, apresentando teores

mais reduzidos nos materiais cultivados na presença da maior concentração de sacarose, em cada tipo de vedação, assim como naqueles provenientes de tubos hermeticamente vedados, em cada concentração de sacarose adicionada aos meios de cultura. As diferenças observadas foram todas significativas, com destaque para os menores valores nos teores de clorofilas totais (45,2%) e de carotenoides totais (50%), ambos em materiais provenientes de tubos vedados e na maior concentração de sacarose.

Assim como observado para os teores de clorofilas *a* e *b*, nas análises realizadas com plantas aclimatizadas, os resultados dos teores de clorofilas e carotenoides totais não diferiram estatisticamente, tanto para a concentração de sacarose quanto para o tipo de vedação.

Também foi notável a redução nos teores de pigmentos totais no material aclimatizado em relação ao cultivado *in vitro*, especialmente naqueles provenientes de meios de cultura contendo GA₃, em frascos vedados e na maior concentração de sacarose, alcançando valores 71,4% menores nos teores de carotenoides totais e 76,6% menores nos teores de clorofilas totais.

c) Relações clorofila *a*/clorofila *b* e clorofilas totais/carotenoides totais

A análise realizada com tecidos de plantas mantidas *in vitro* evidenciou efeitos significativos na relação clorofila *a*/clorofila *b* (Cla/Clb) somente naqueles materiais mantidos em presença de ANA, com valores 20 e 12,8% menores na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente para tecidos provenientes de tubos não vedados e hermeticamente vedados (Figura 13). Quando foram comparados os efeitos do tipo de tampa dos frascos de cultivo *in vitro*, os materiais provenientes de tubos vedados apresentaram maior relação Cla/Clb, com média de 2,04. Os resultados não diferiram nos materiais mantidos em meios de cultura contendo GA₃, independentemente da concentração de sacarose e do tipo de vedação utilizados.

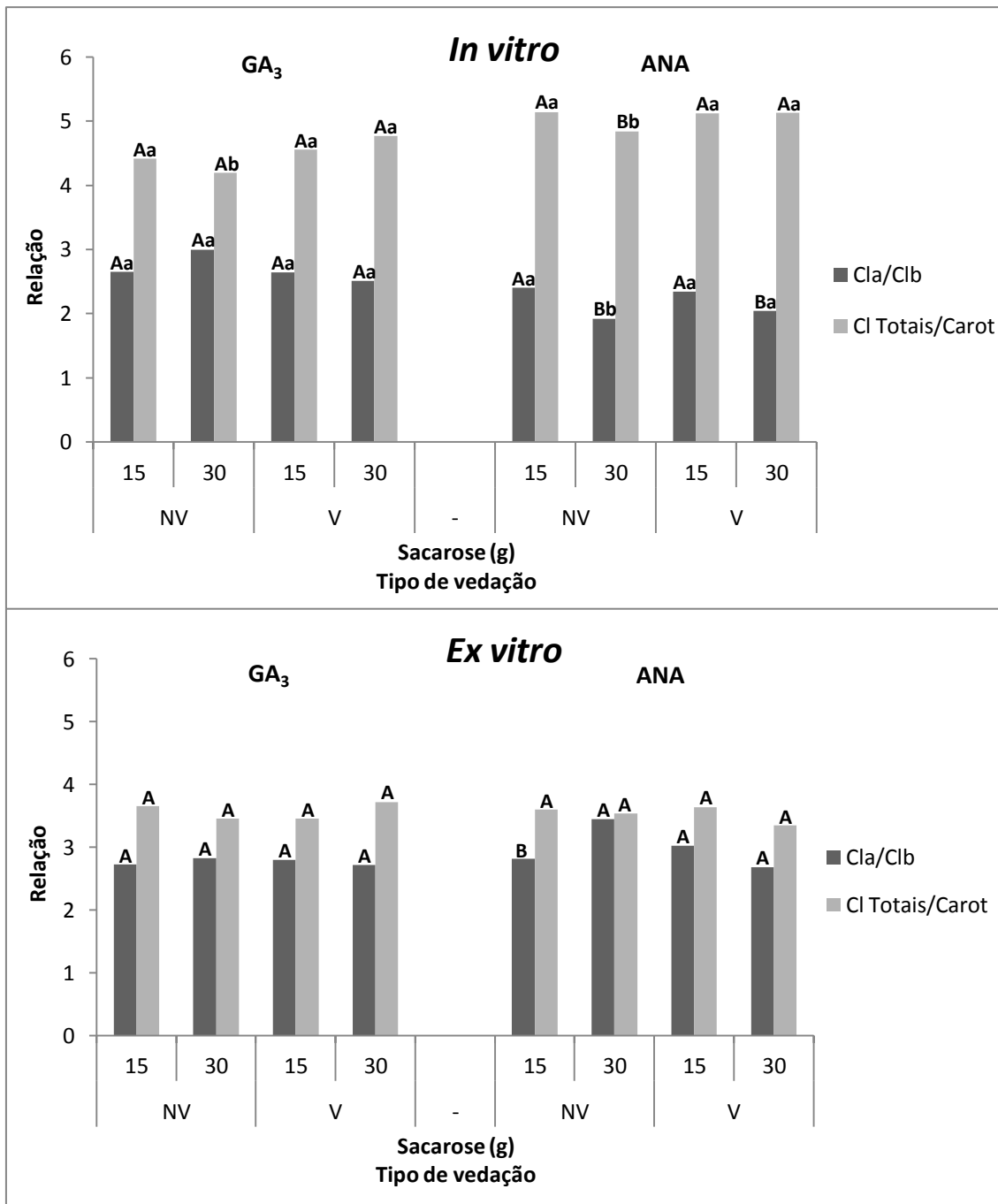


Figura 13. Relação entre clorofilas *a* e *b* (Cla/Clb) e entre clorofilas e carotenoides totais (Cl Totais/Carot) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* cultivados *in vitro* durante 150 dias na presença de GA₃ ou ANA, em duas concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e sob dois tipos de vedação (não vedado ou vedado – NV ou V), e 180 dias após aclimatização *ex vitro*. Em cada regulador de crescimento (GA₃ ou ANA), as colunas identificadas por letras maiúsculas comparam os efeitos da concentração de sacarose em cada tipo de vedação, e as colunas identificadas por letras minúsculas comparam os efeitos do tipo de vedação utilizado *in vitro* em cada concentração de sacarose. As colunas identificadas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Uma resposta ligeiramente diferente foi observada para a relação entre clorofilas totais/carotenoides totais (Cl Totais/Carot). Tecidos mantidos em meio contendo 30 gL⁻¹

de sacarose e na presença de ANA apresentaram valores 5,8% menores para essa relação quando provenientes de tubos de ensaio não vedados, não havendo, contudo, diferenças nos vedados. Já com relação à vedação, valores menores foram encontrados em resposta à maior concentração de sacarose nos tecidos provenientes de tubos não vedados. Por outro lado, para materiais mantidos em presença de GA₃, os resultados não diferiram em resposta à concentração de sacarose, embora nos tecidos provenientes de plantas mantidas em meio de cultura contendo a maior concentração de sacarose a relação CI Totais/Carot tenha sido menor nos tubos não vedados em comparação aos que não permitiam trocas gasosas.

A mesma uniformidade dos dados observada nas quantificações dos conteúdos das clorofilas *a*, *b* e totais e dos carotenoides totais, nas análises realizadas com materiais aclimatizados *ex vitro*, também foi observada para as relações Cla/Clb e CI Totais/Carot. Não foram encontradas diferenças significativas nessas relações nos materiais provenientes de meios de cultura em que o GA₃ foi utilizado. As únicas diferenças significativas foram observadas para a relação Cla/Clb em materiais provenientes de meios de cultura suplementados com ANA, com valores 22,4% maiores naqueles mantidos em meios adicionados de 30 g L⁻¹ de sacarose, em tubos não vedados.

De maneira geral, as relações Cla/Clb foram, em média, 30,2% menores nos materiais após 180 dias de aclimatização, em relação aos mantidos *in vitro*, ocorrendo exatamente o contrário com as relações CI Totais/Carot, que apresentaram aumentos de 17 até 79,1% nos materiais aclimatizados, especialmente naqueles provenientes de meios contendo ANA.

3.2 – Análises bioquímicas das plantas submetidas à desidratação progressiva e posterior reidratação

As plantas utilizadas nos experimentos de desidratação e de reidratação foram procedentes de cultivos *in vitro* em meios de cultura contendo GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ de sacarose, ambos provenientes de tubos de ensaio hermeticamente vedados, correspondendo aos tratamentos **4** e **6** da fase de micropropagação. Esses tratamentos foram selecionados em função da maior

disponibilidade de indivíduos viáveis após o período de aclimatização, assim como do melhor desenvolvimento apresentado por eles (Figura 14).

As plantas aclimatizadas procedentes desses dois tratamentos foram, então, submetidas a intervalos crescentes de desidratação: 0, 30, 42 e 54 dias sem irrigação (Figura 15). Posteriormente, todas as plantas retornaram para casa de vegetação, sendo, então, reidratadas sob irrigação periódica, durante 90 dias (Figura 16).

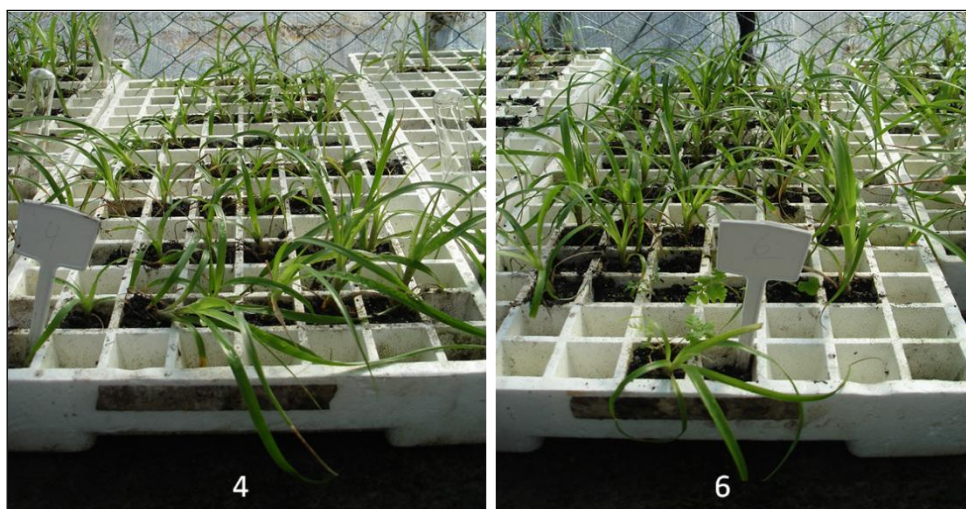


Figura 14. Plantas de *Pitcairnia encholirioides* em aclimatização, cultivadas *in vitro* na presença de 10 μM GA₃, 30 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas (4) e 0,2 μM ANA, 15 g L⁻¹ de sacarose, tampas vedadas (6).

3.2.1 – Prolina

Nos materiais submetidos à desidratação, os conteúdos de prolina apresentaram comportamentos específicos em resposta ao prolongamento do estresse e da procedência das plantas utilizadas no ensaio. Houve acúmulo significativo desse aminoácido somente nos materiais cultivados anteriormente em meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃. Apesar de ter havido uma tendência de acúmulo de prolina nos materiais provenientes de meios contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, não foram encontradas diferenças significativas nos resultados com o prolongamento do tempo de desidratação (Figura 17). Percebeu-se, portanto, que o aumento no conteúdo de prolina ocorreu somente nos materiais submetidos à desidratação que anteriormente foram mantidos *in vitro* na concentração mais elevada de sacarose e em presença de GA₃.

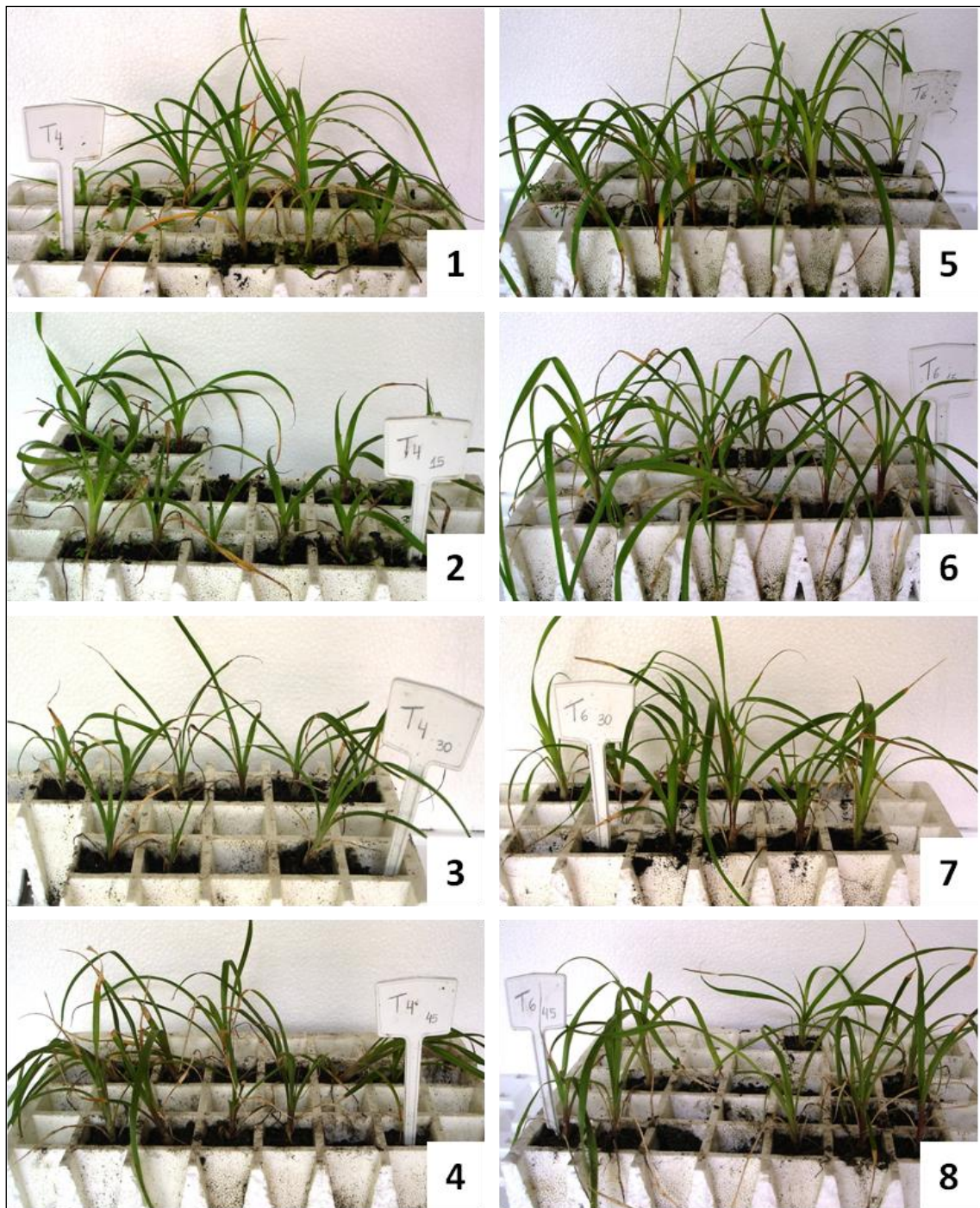


Figura 15. Plantas de *Pitcairnia encholirioides* submetidas à desidratção progressiva. Os números **1 a 4** correspondem a plantas provenientes de tratamentos *in vitro* com 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ e os números **5 a 8**, plantas cultivadas em meio com 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA. Tratamentos: **1 e 5)** mantido sob irrigação periódica; **2 e 6)** 30 dias sem irrigação; **3 e 7)** 42 dias sem irrigação; **4 e 8)** 54 dias sem irrigação.

Apesar de não terem sido realizadas análises estatísticas comparando os tratamentos com a maior e a menor concentração de sacarose, foi interessante notar que o acúmulo de prolina sempre foi mais intenso nos materiais procedentes dos meios de

cultura contendo 30 g L^{-1} de sacarose e GA_3 do que naqueles provenientes de meios suplementados com 15 g L^{-1} de sacarose e ANA, tendo as diferenças nos conteúdos de prolina entre esses dois tratamentos aumentado com o passar do tempo de desidratação.



Figura 16. Plantas de *Pitcairnia encholirioides* após 90 dias de reidratação. Os números **1 a 4** correspondem a plantas provenientes de tratamentos *in vitro* com 30 g L^{-1} de sacarose e GA_3 e os números **5 a 8**, plantas cultivadas em meio com 15 g L^{-1} de sacarose e ANA. Tratamentos referentes à desidratação prévia: **1 e 5)** sob irrigação periódica; **2 e 6)** 30 dias sem irrigação; **3 e 7)** 42 dias sem irrigação; **4 e 8)** 54 dias sem irrigação.

Após a reidratação, não foram encontradas diferenças entre os materiais previamente desidratados e o controle, não submetido ao estresse hídrico, fato esse indicativo da recuperação metabólica das plantas submetidas ao estresse hídrico, pelo menos no que diz respeito ao acúmulo de prolina.

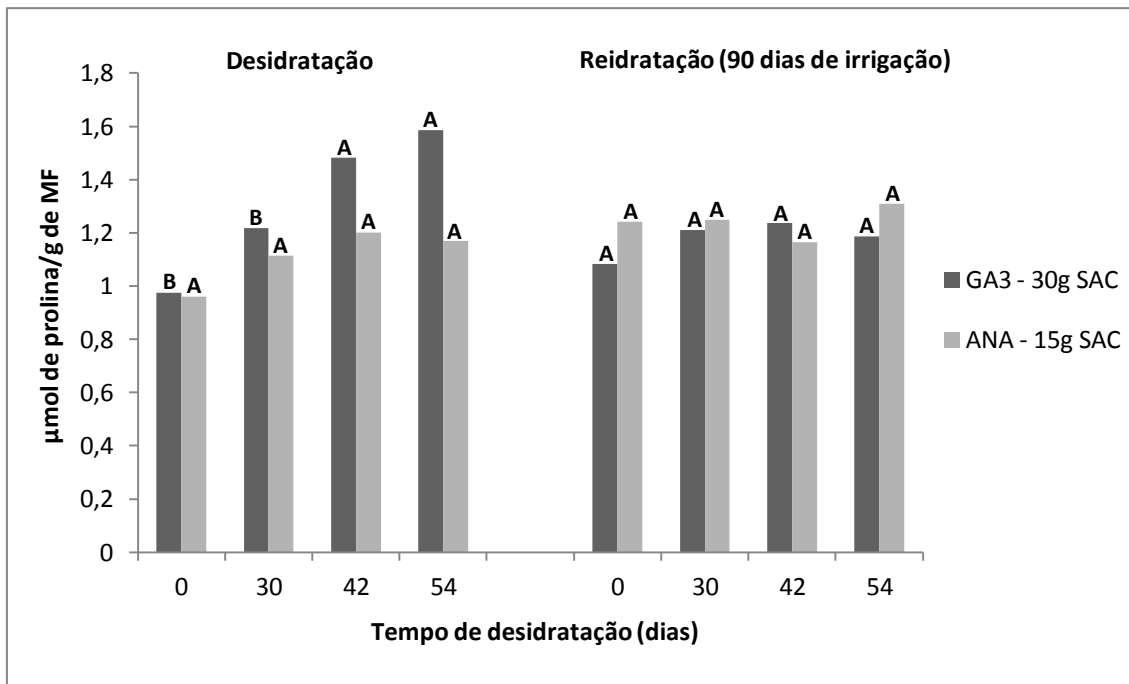


Figura 17. Conteúdos de prolina em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2.2 – Proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais apresentou aumentos significativos em resposta ao prolongamento do tempo de desidratação, independentemente da procedência das plantas utilizadas (Figura 18). Para materiais provenientes de tubos suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ houve um aumento de 126,8% no conteúdo de proteínas totais no maior tempo de desidratação quando comparado com os materiais não submetidos ao estresse hídrico. Para materiais provenientes de meios contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA esse aumento foi ainda maior, de aproximadamente 133%, no mesmo período de estresse hídrico.

Após 90 dias de reidratação, as diferenças encontradas entre os tratamentos desapareceram. Para cada um dos reguladores de crescimento e suas respectivas concentrações de sacarose, não foram observadas diferenças significativas entre os materiais submetidos aos períodos crescentes de desidratação.

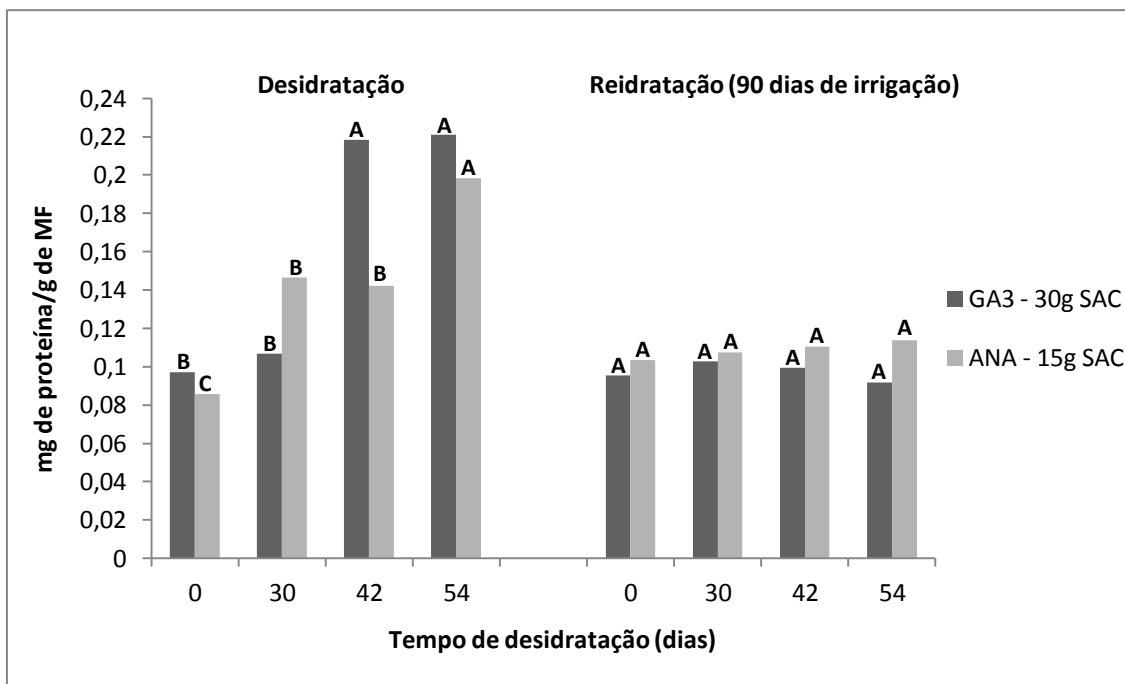


Figura 18. Teores de proteínas totais em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Foi interessante notar, também, que os teores de proteínas totais encontrados após reidratação, entre 0,091 e 0,113 mg de proteína/g de matéria fresca, foram bastante próximos aos daqueles materiais que não sofreram desidratação (0,097 mg/g de MF).

3.2.3 – Enzimas do metabolismo antioxidativo (superóxido dismutase, catalase, peroxidase e polifenol oxidase)

a) Superóxido dismutase (SOD)

Nos materiais provenientes da maior concentração de sacarose e GA₃, observou-se redução significativa na atividade da SOD em relação ao controle em resposta à desidratação, independentemente do tempo de estresse hídrico (Figura 19). A diminuição na atividade enzimática chegou a 36,8% ao final do período de estresse. Em

contraste, nos materiais provenientes da menor concentração de sacarose e ANA, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em resposta ao prolongamento do tempo de desidratação. Percebeu-se, contudo, que a atividade da SOD foi sempre mais elevada nas plantas provenientes da maior concentração de sacarose e GA₃.

Assim como observado para os conteúdos de proteínas totais e de prolina, também para a SOD não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle após a reidratação nos materiais provenientes dos diferentes intervalos de estresse hídrico, independentemente da sua origem.

Em contraste ao que foi notado durante a desidratação, após a reidratação a SOD apresentou maiores atividades nos tecidos oriundos de meios de cultura contendo a menor concentração de sacarose e ANA.

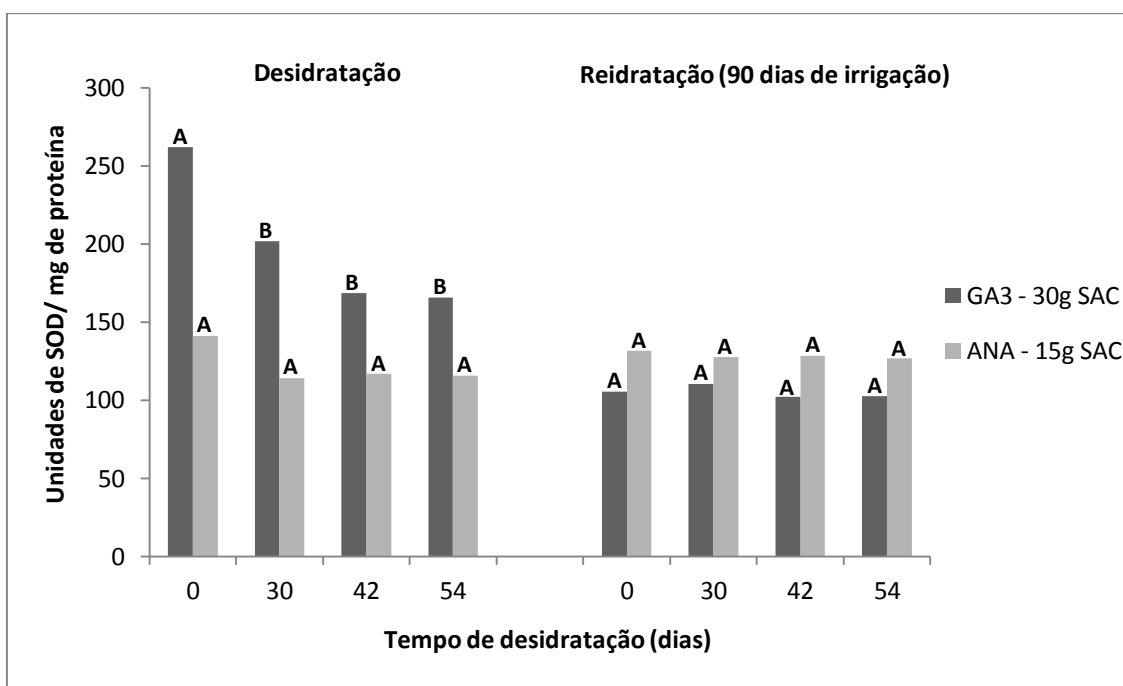


Figura 19. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

b) Catalase (CAT)

Em relação à atividade da CAT, não foram encontradas diferenças significativas em resposta ao prolongamento do tempo de desidratação nos tratamentos provenientes da maior concentração de sacarose e GA₃ (Figura 20). Entretanto, nos materiais provenientes dos meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, houve, em relação ao controle, redução de 36,7% na atividade enzimática após 30 dias de desidratação, permanecendo a atividade inalterada estatisticamente até o último período de estresse hídrico.

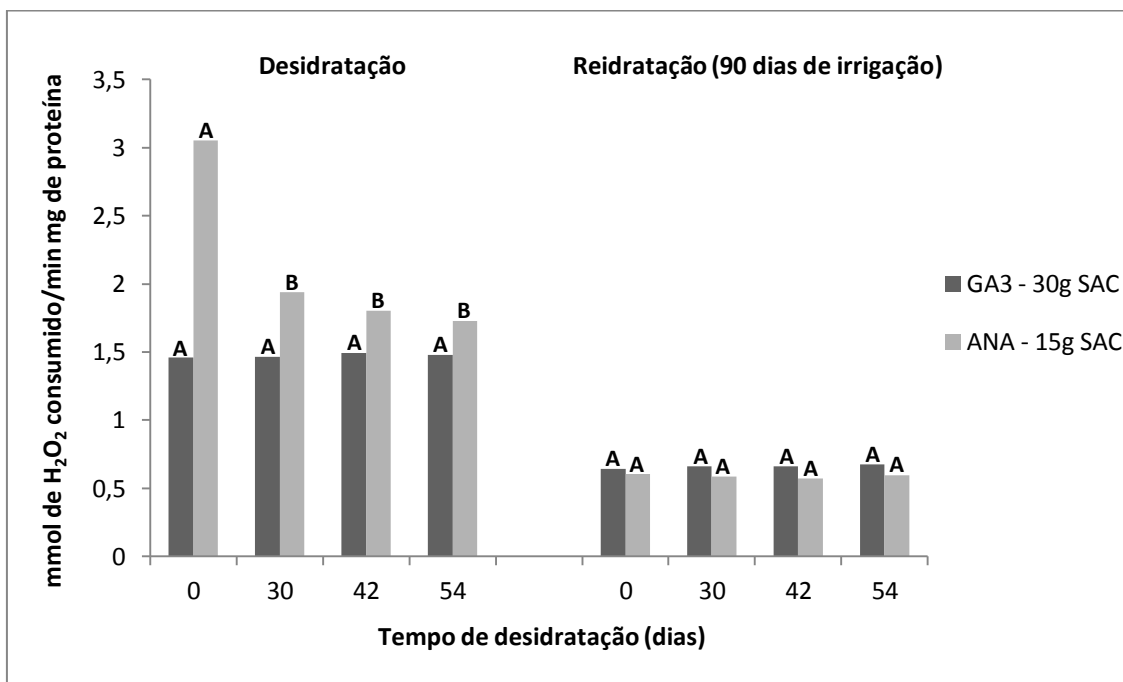


Figura 20. Atividade da enzima catalase (CAT) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Deve-se ressaltar que a CAT apresentou atividade mais intensa nos materiais procedentes da concentração mais baixa de sacarose, em relação ao meio em que 30 g L⁻¹ desse carboidrato havia sido utilizado *in vitro*, sendo que as diferenças entre ambos tenderam a reduzir com o passar do tempo de desidratação.

No experimento realizado após a reidratação, não foram encontradas diferenças entre os materiais submetidos previamente à desidratação e o controle, sendo os resultados semelhantes estatisticamente. Na maior concentração de sacarose, em meio contendo GA₃, a atividade da CAT foi, em média, 64% menor nos materiais após a reidratação, em comparação àqueles submetidos à desidratação. As diferenças observadas nos materiais provenientes da menor concentração de sacarose e com ANA foram ainda maiores, com médias das atividades enzimáticas 72,4% menores nos materiais após a reidratação.

c) Peroxidase (POD)

A atividade da POD apresentou comportamentos distintos em resposta aos dois tratamentos utilizados *in vitro*. Nos materiais provenientes de meios contendo a maior concentração de sacarose e GA₃ verificou-se um aumento de 258% na atividade enzimática até o 42º dia de desidratação, sendo esse incremento estatisticamente semelhante ao dos materiais mantidos por 54 dias sob estresse hídrico (Figura 21).

Porém, para tecidos provenientes da menor concentração de sacarose, após o 30º dia de estresse hídrico houve redução média de 25,3% na atividade da POD, mantendo-se nesse nível até a última análise realizada.

Após a reidratação, a POD não apresentou diferenças em sua atividade nos materiais provenientes dos diferentes tratamentos de desidratação, com valores similares aos do controle. Vale ressaltar, ainda, que os valores encontrados foram, em geral, menores que aqueles observados nos materiais submetidos ao estresse hídrico, com exceção daqueles provenientes de meios contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, que apresentaram maior atividade da POD no grupo controle após a reidratação.

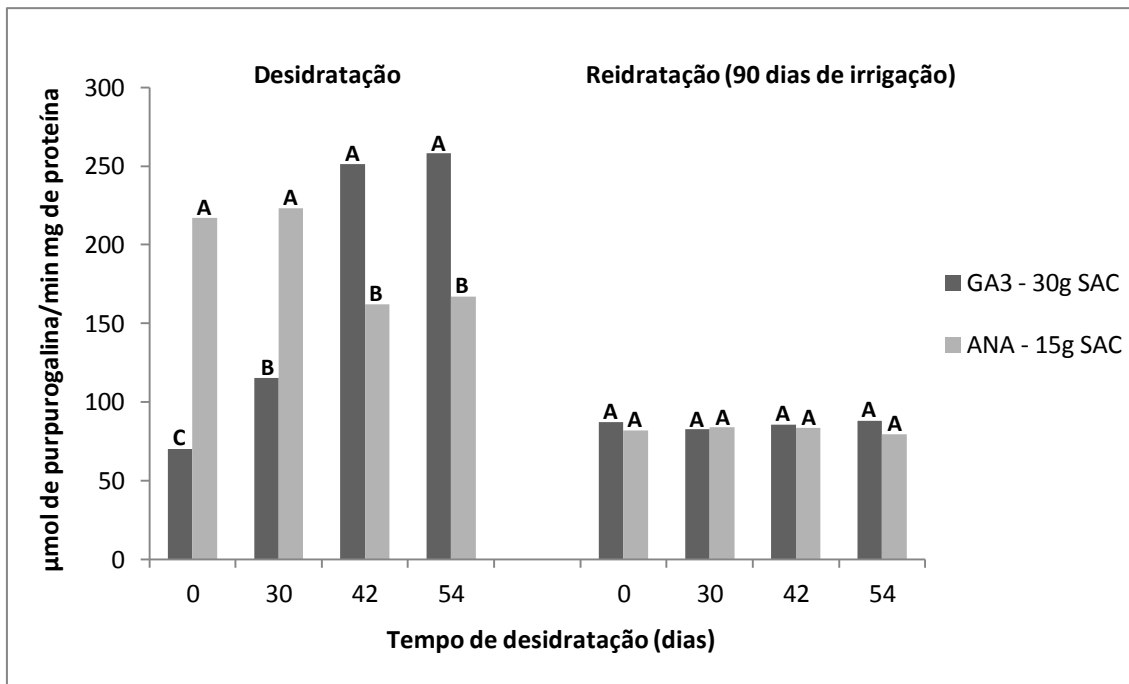


Figura 21. Atividade da enzima peroxidase (POD) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

d) Polifenol oxidase (PPO)

A atividade da PPO apresentou tendência de redução com o passar do tempo de desidratação para ambas as concentrações de sacarose e seus respectivos reguladores de crescimento (Figura 22), embora a redução tenha sido mais pronunciada nos tratamentos previamente cultivados *in vitro* na presença de 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, alcançando, em relação ao controle, valores 45,2% menores nos tratamentos submetidos ao maior tempo de desidratação.

Na maior concentração de sacarose, diferenças significativas foram observadas apenas na análise realizada no 42º dia de desidratação, com a atividade enzimática se mantendo inalterada até o 54º dia de estresse hídrico. A atividade da PPO não diferiu estatisticamente em relação ao controle até o 30º dia de estresse hídrico.

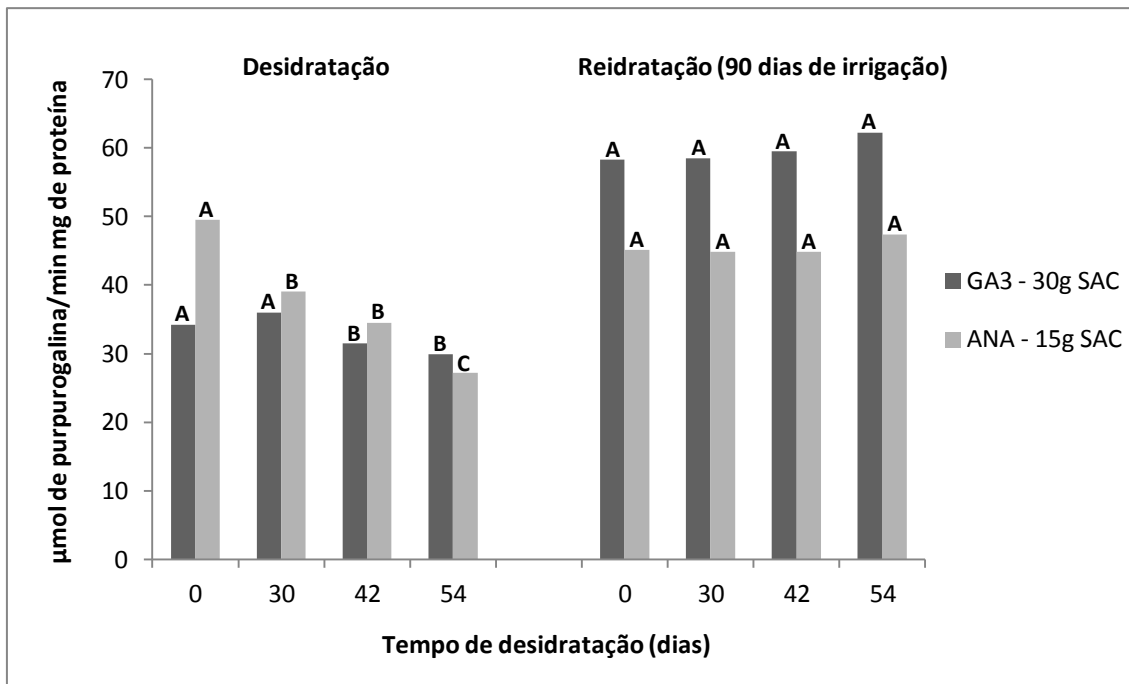


Figura 22. Atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratção. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados das atividades da PPO após reidratação foram estatisticamente semelhantes entre si, em cada concentração de sacarose e com o respectivo regulador de crescimento, independentemente do tempo que as plantas passaram sob estresse hídrico, indicando a recuperação de ambos os materiais com relação à atividade dessa enzima. Adicionalmente, foi possível observar que, após a reidratação, os valores das atividades da PPO foram, em média, 23,6% menores nos materiais cultivados previamente com 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, em comparação aos mantidos em presença de 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃.

A maioria dos resultados encontrados sugere que as plantas submetidas à desidratção progressiva apresentaram recuperação metabólica após a reidratação, pelo menos com relação à atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo e aos teores de prolina.

3.2.4 – Pigmentos

a) Teores de clorofila *a* e clorofila *b*

Os teores de clorofilas *a* e *b* aumentaram em resposta ao prolongamento do tempo de desidratação somente nos materiais cultivados *in vitro* na presença da maior concentração de sacarose e GA₃ (Figura 23). Para a clorofila *a*, houve aumento de 129,5% do controle até o 54º dia de estresse, e para clorofila *b* esse aumento foi de 161,1%. Os resultados com materiais provenientes de meios contendo ANA e a menor concentração de sacarose não apresentaram comportamento uniforme, oscilando com o passar do tempo de estresse hídrico, para ambos os tipos de clorofila.

No ensaio de reidratação, os teores de clorofila *a* apresentados pelas plantas anteriormente submetidas à desidratação não diferiram em relação ao controle para materiais provenientes de 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃, embora tenha havido uma tendência de maior acúmulo desses pigmentos nos tratamentos submetidos a estresses hídricos mais longos. Para materiais provenientes de meios contendo ANA e 15 g L⁻¹ de sacarose, diferenças significativas foram observadas apenas para aqueles submetidos a 54 dias de estresse hídrico, com aumento de 23% no conteúdo de clorofila *a* em relação ao controle.

Para clorofila *b* observou-se uma resposta diferente. Materiais provenientes de plantas anteriormente mantidas na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ e submetidos à desidratação acumularam, em média, 46,6% mais clorofila *b* do que o controle. Com relação ao material tratado previamente com 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, não foi observada uniformidade nos resultados, com os mesmos oscilando entre os diferentes tratamentos. Apesar desse fato, entre o grupo controle e o que permaneceu mais tempo sob estresse, houve aumento de 31,8% no teor de clorofila *b*.

Principalmente com relação aos materiais provenientes do tratamento contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃, maiores conteúdos de clorofilas *a* e *b* foram encontrados nos tecidos das plantas submetidas à desidratação, especialmente nos dois maiores tempos de estresse hídrico, em comparação aos resultados observados na análise realizada com as plantas após 90 dias de reidratação.

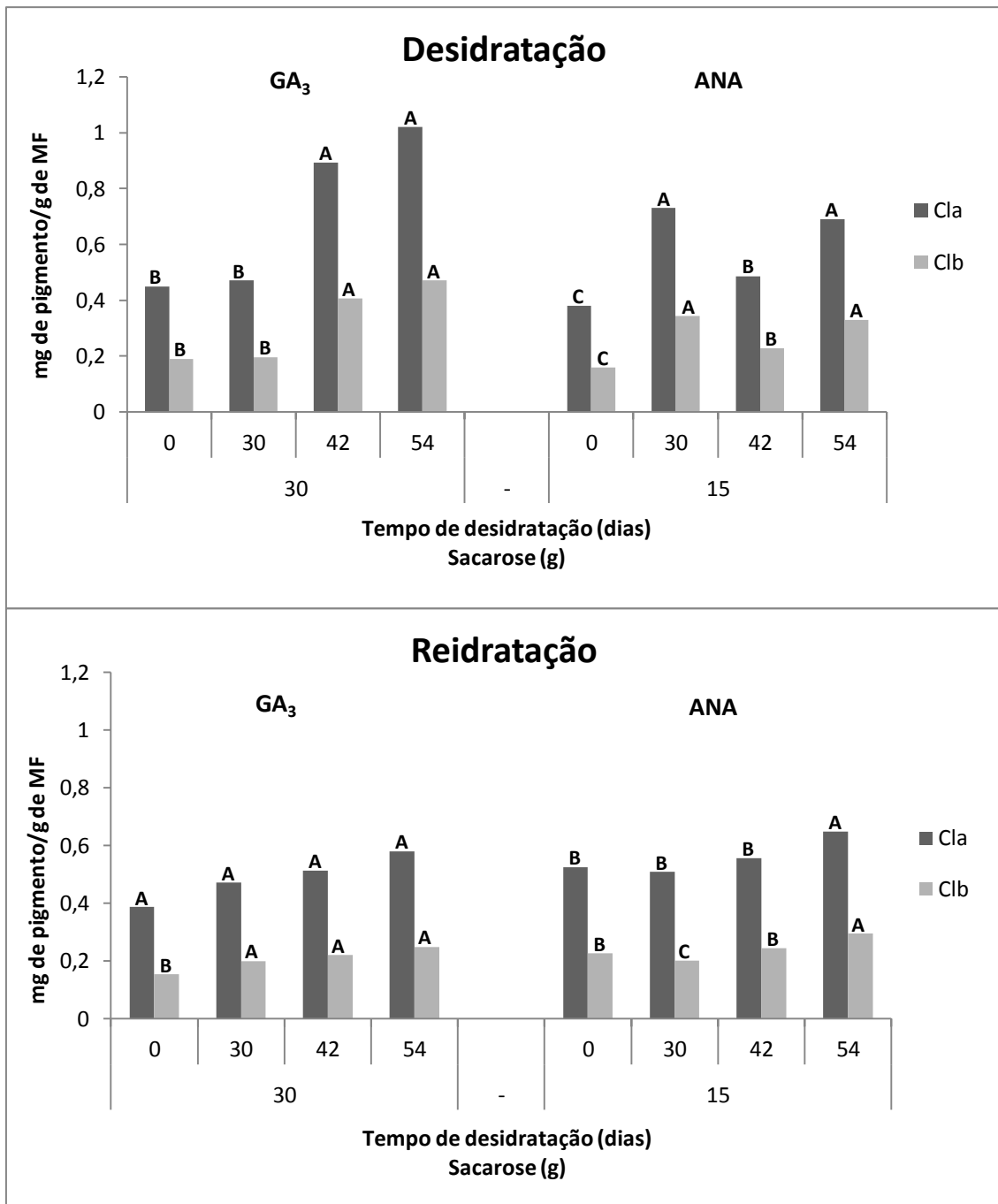


Figura 23. Teores de clorofila *a* (Cla) e clorofila *b* (Clb) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

b) Teores de clorofilas totais e carotenoides totais

Os teores de clorofilas e carotenoides totais apresentaram o mesmo comportamento observado para clorofilas *a* e *b*, com tendência de aumento no acúmulo desses pigmentos com o passar do tempo de estresse para materiais anteriormente cultivados em presença de 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃. Para materiais mantidos em presença de 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, os resultados não apresentaram uniformidade (Figura 24). Os aumentos observados nos teores de clorofilas totais após 54 dias de estresse hídrico foram de aproximadamente 135% em relação ao controle. Para os carotenoides esses aumentos foram em média de 171,4%.

Nas plantas submetidas à reidratação, os teores de clorofilas e carotenoides totais não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos nos materiais provenientes da maior concentração de sacarose e GA₃. Para materiais provenientes da menor concentração de sacarose e ANA, plantas desidratadas durante 54 dias apresentaram resultados, em média, 24,8% maiores que os demais tratamentos para clorofilas totais e 28,8% maiores para carotenoides totais. Esse foi o único tratamento que diferiu significativamente dos demais.

Os teores de clorofilas e carotenoides totais nas plantas provenientes de tratamentos contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ foram menores nos tecidos das plantas após a reidratação quando comparado com os materiais submetidos à desidratação, especialmente naqueles mantidos por 42 e 54 dias de estresse hídrico.

c) Relações clorofila *a*/clorofila *b* e clorofilas totais/carotenoides totais

As relações clorofila *a*/clorofila *b* e clorofilas totais/carotenoides totais apresentaram ligeira tendência de redução com o passar do tempo de desidratação, independentemente da concentração de sacarose e do regulador de crescimento utilizados durante o cultivo *in vitro* (Figura 25). No entanto, as respostas observadas variaram.

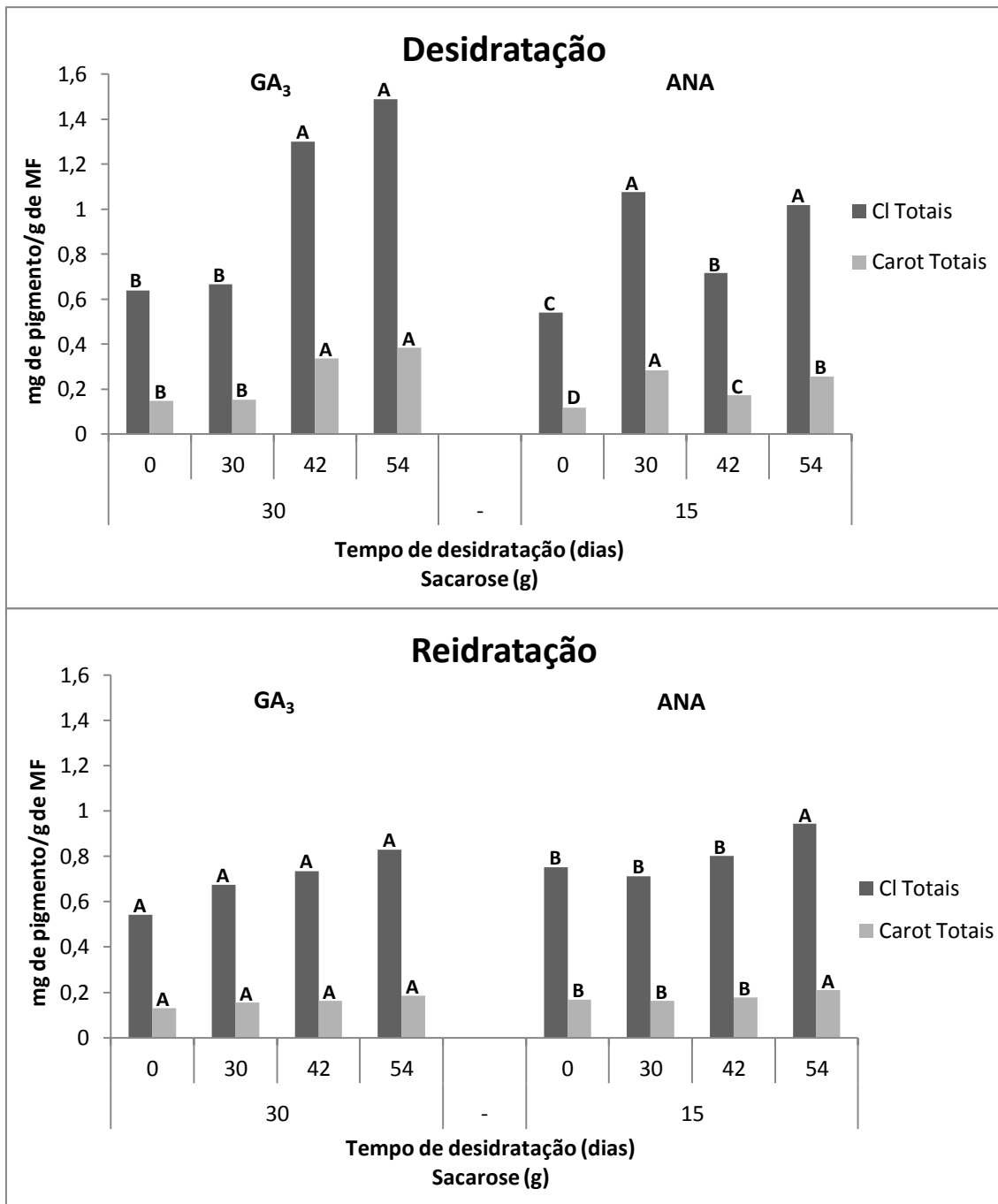


Figura 24. Teores de clorofilas (CI Totais) e carotenoides totais (Carot Totais) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

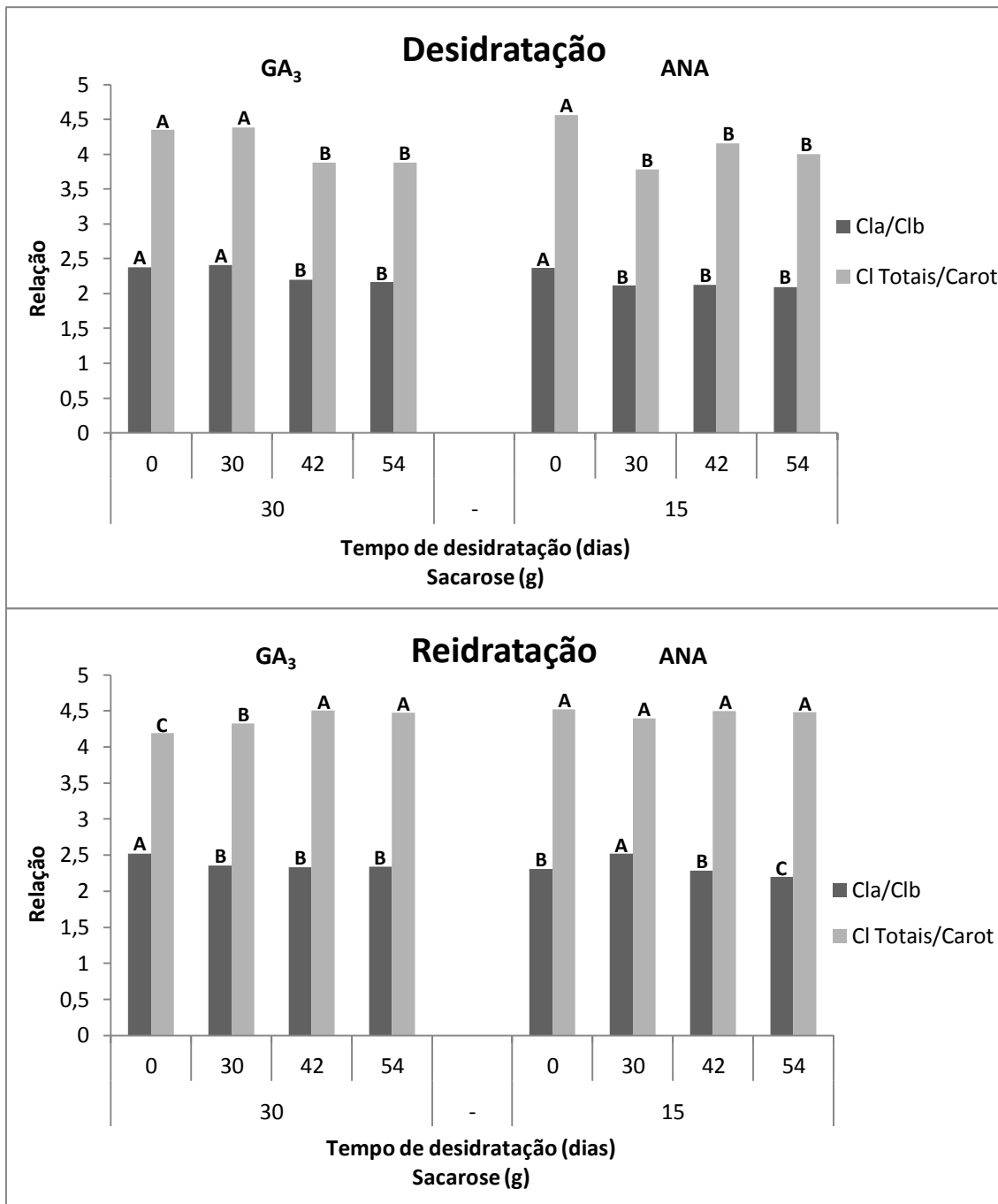


Figura 25. Relação entre clorofilas *a* e *b* (Cla/Clb) e entre clorofilas e carotenoides totais (CI Totais/Carot) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratção. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Materiais provenientes de plantas mantidas anteriormente em presença de 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ apresentaram redução média de 11,1%, tanto para a relação

Cla/Clb quanto para Cl totais/Carot, nos tecidos mantidos por 42 e 54 dias de desidratação. Para materiais provenientes de tratamentos contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, houve redução média de 12,6% do controle para os demais tratamentos submetidos à carência de água.

Após a reidratação, de maneira geral, os valores obtidos nos tratamentos submetidos ao estresse hídrico foram significativamente diferentes dos encontrados no grupo controle, exceto para a relação clorofilas totais/carotenoides totais em materiais oriundos de meios de cultura suplementados previamente com a menor concentração de sacarose e ANA. Nos demais tratamentos, os resultados apresentaram tendências distintas.

3.2.5 – Carboidratos

a) Carboidratos solúveis totais (CST)

Os teores de carboidratos solúveis totais (CST) aumentaram com o prolongamento do estresse hídrico, independentemente do conteúdo de sacarose e do regulador de crescimento previamente utilizados *in vitro* (Figura 26). Os aumentos dos CST nas plantas submetidas a 54 dias de desidratação foram de 45,5%, em relação ao controle, para materiais provenientes de meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ e de 47,6% para materiais oriundos de meios contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA.

Após a reidratação, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos submetidos anteriormente à desidratação e o controle. Percebeu-se, entretanto, que durante o período de desidratação avaliado, independentemente da origem dos materiais, o teor de carboidratos solúveis totais foi sempre maior nos tecidos provenientes de plantas cultivadas em meios de cultura suplementados com a menor concentração de sacarose e ANA. Outro fato notável foi a diferença observada entre o acúmulo de CST pelas plantas durante a desidratação e após reidratação. Os valores foram consideravelmente menores após o período de recuperação, com redução média de 72,7% nos valores obtidos.

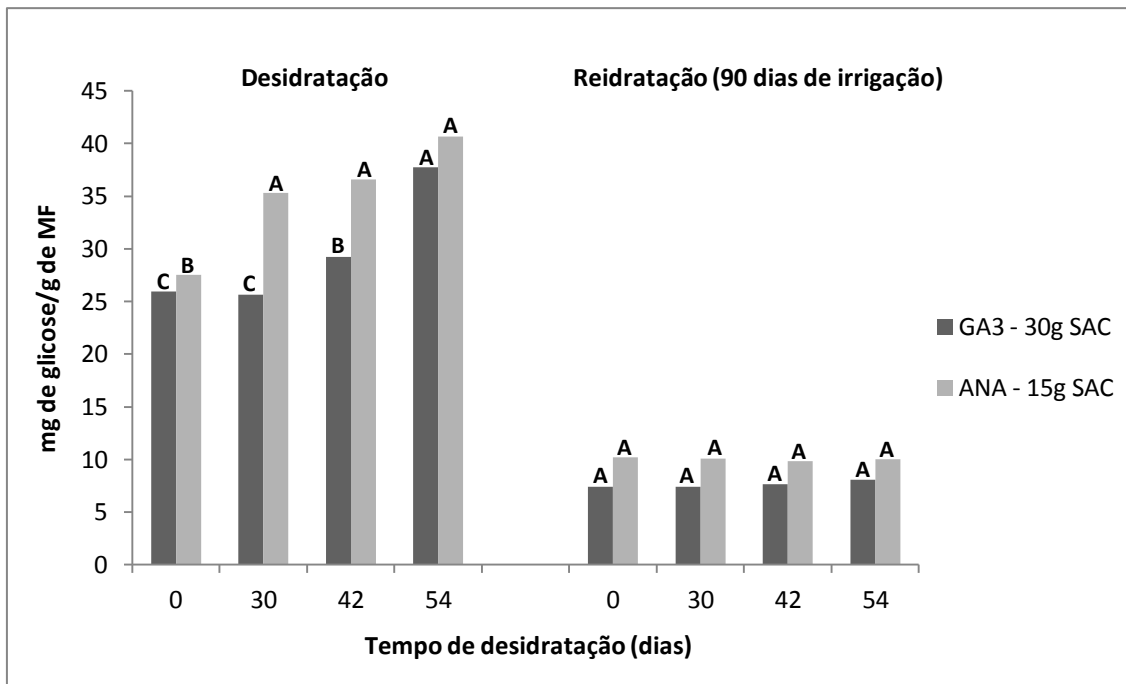


Figura 26. Teores de carboidratos solúveis totais (CST) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

b) Sacarose

O comportamento das plantas com relação ao acúmulo de sacarose foi similar ao observado para carboidratos solúveis totais (Figura 27). Houve tendência de aumento nos teores desse carboidrato nos tecidos durante o prolongamento do estresse hídrico. Para materiais provenientes da maior concentração de sacarose e GA₃, o único resultado estatisticamente diferente foi o apresentado pelas plantas submetidas a 54 dias de estresse hídrico, com acúmulo de sacarose 22,7% maior que o observado nas plantas dos demais tratamentos. Nos materiais provenientes da menor concentração de sacarose e ANA, todos os resultados foram estatisticamente diferentes do controle, que acumulou aproximadamente 27% menos sacarose que os demais.

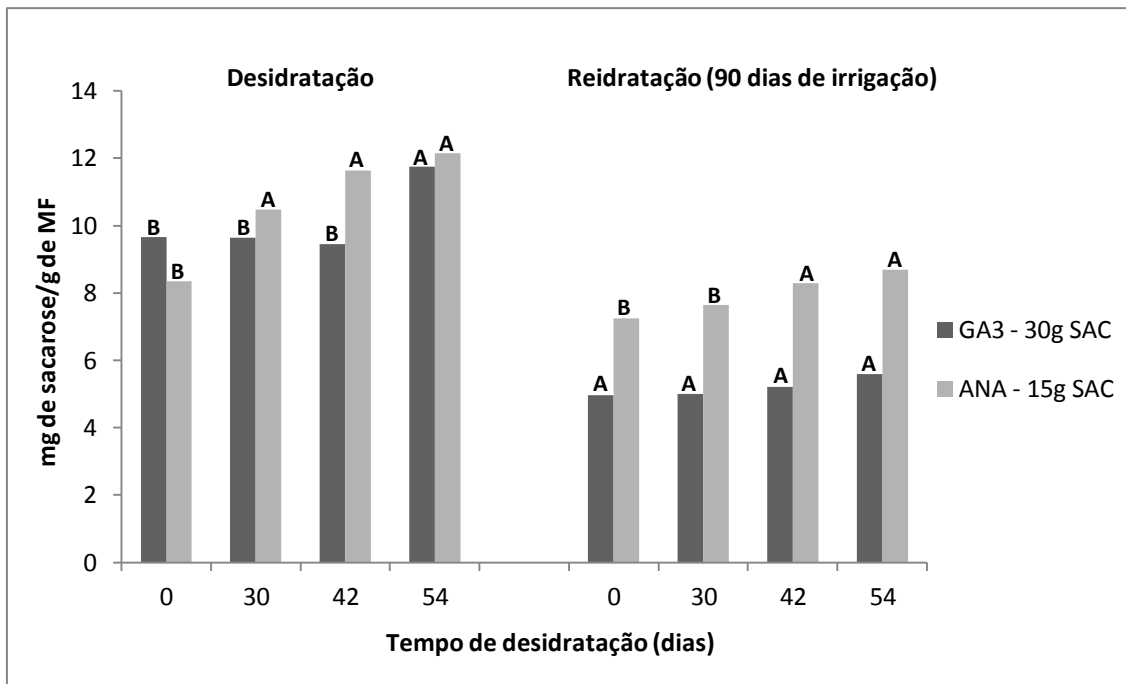


Figura 27. Teores de sacarose em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Nas análises realizadas após a reidratação, houve uniformidade dos resultados nos tratamentos com a maior concentração de sacarose e GA₃, havendo ligeiro aumento no acúmulo de sacarose nos dois tratamentos submetidos aos maiores tempos de estresse hídrico apenas para materiais crescidos *in vitro* em presença de 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA. Após a reidratação, também houve maior acúmulo de sacarose nas plantas previamente cultivadas *in vitro* com a menor concentração de sacarose e ANA, em relação ao tratamento com 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃.

Assim como observado para CST, os teores de sacarose encontrados foram menores após a reidratação, em comparação com os materiais submetidos ao estresse hídrico.

c) Açúcares redutores (AR)

Os teores de açúcares redutores (AR) apresentaram o mesmo comportamento observado para os teores de carboidratos solúveis totais (Figura 28). Houve tendência de aumento no acúmulo de AR com o prolongamento do estresse hídrico e os valores encontrados após reidratação não apresentaram diferenças estatísticas entre si, sendo consideravelmente menores que os encontrados nas análises realizadas durante a desidratação.

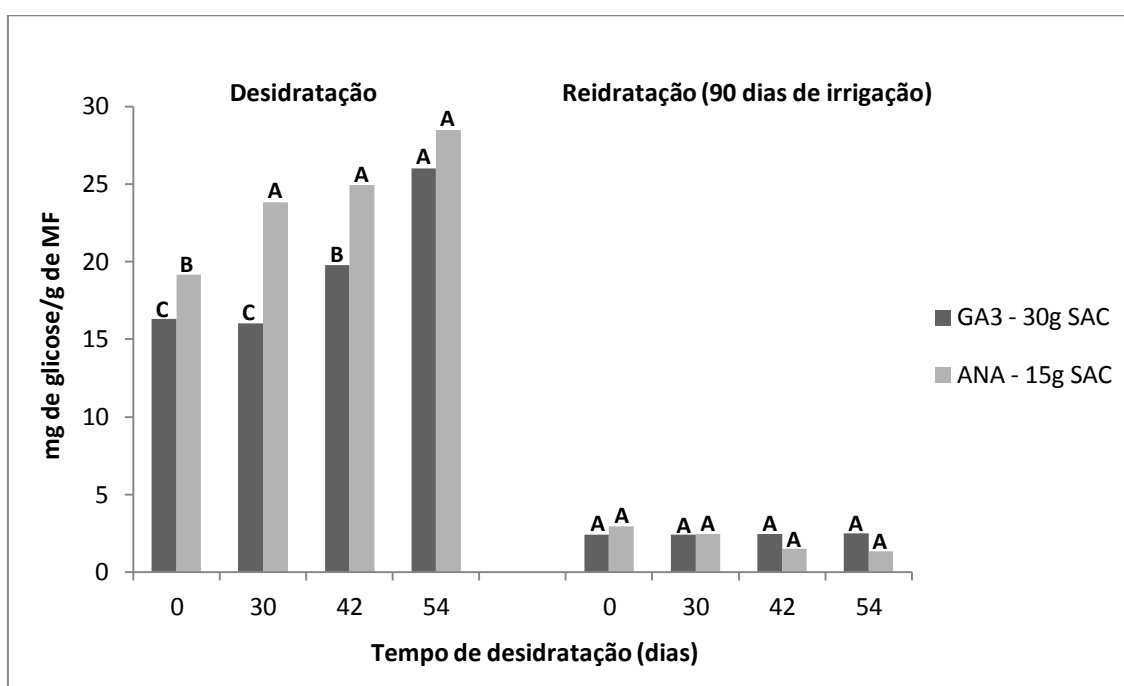


Figura 28. Teores de açúcares redutores (AR) em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

d) Amido

Não foram encontradas diferenças estatísticas nos teores de amido acumulado em resposta ao prolongamento da desidratação nos materiais provenientes de plantas cultivadas previamente com 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ (Figura 29). Porém, na menor

concentração de sacarose e ANA, houve acúmulo significativo de amido após 42 e, principalmente, após 54 dias de estresse hídrico. Em comparação com o controle, houve acréscimo de 112,4% no teor de amido acumulado após o maior tempo de desidratação.

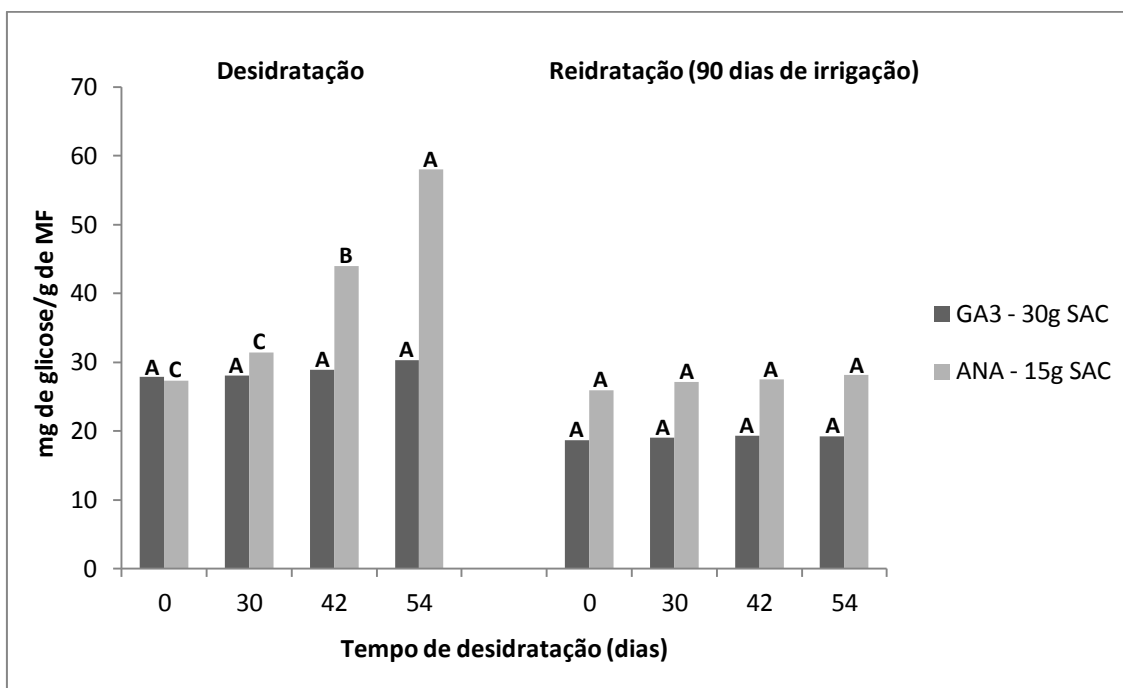


Figura 29. Teores de amido em tecidos foliares de *Pitcairnia encholirioides* provenientes de tubos de ensaio com tampas vedadas, em meios de cultura com GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose ou ANA e 15 g L⁻¹ sacarose, após aclimatização *ex vitro*, submetidos a períodos crescentes de estresse hídrico (desidratação) e após reidratação. Em cada condição (desidratação ou reidratação), as colunas identificadas por letras maiúsculas (em cada concentração de sacarose e seu respectivo regulador de crescimento) comparam os efeitos do tempo de desidratação. As colunas identificadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Assim como observado para o acúmulo dos outros carboidratos analisados, não houve diferenças significativas nos teores de amido entre os tratamentos e o controle após a reidratação. Esses resultados demonstram que houve recuperação do metabolismo de carboidratos das plantas após a reidratação, independentemente do tempo que passaram sob condições de estresse hídrico.

Também foram encontrados menores teores de amido nos materiais reidratados, demonstrando que o fornecimento de água para os materiais previamente desidratados restabeleceu os teores de carboidratos aos níveis do grupo controle, não submetido ao estresse hídrico, evidenciando-se, assim, elevada capacidade de recuperação das plantas após um período de quase dois meses de privação da água.

4 – Discussão

Após 150 dias de cultivo *in vitro* foi observado um elevado percentual de mortalidade das plantas, em média de 57,6%, devido, provavelmente, ao prolongamento da permanência das plantas nessas condições. Em meio de cultura contendo GA₃, independentemente do tipo de vedação, ocorreu maior mortalidade nos materiais adicionados de 15 g L⁻¹ de sacarose. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de haver, nesse meio de cultura, menor pressão osmótica e maior disponibilidade de água para a planta, o que pode contribuir para a ocorrência de estresses oxidativos, senescência e morte dos explantes.

4.1 – Prolina

Uma importante resposta das plantas ao estresse hídrico é o acúmulo de solutos compatíveis, fenômeno conhecido como ajustamento osmótico (Bray, 1993; Mahajan & Tuteja, 2005; Evers *et al.*, 2010). O acúmulo de solutos mantém o potencial osmótico da planta, levando à manutenção da capacidade de absorção de água e à tolerância aos estresses (Kavi Kishor *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2010). Sob condições de crescimento *in vitro*, concentrações elevadas de sacarose adicionadas ao meio de cultura geram maiores pressões osmóticas, causando estresse osmótico e redução no acúmulo de água pelas plantas. Os maiores acúmulos de prolina observados nos tratamentos que receberam 30 g L⁻¹ de sacarose *in vitro* são indicativos das respostas das plantas ao estresse osmótico provocado pela presença desse carboidrato, em meio de cultura contendo ANA (Figura 5). Por sua vez, em meio de cultura contendo GA₃, devido ao fato de não ter havido diferenças significativas no acúmulo de prolina em resposta à maior concentração de sacarose (Figura 5), é provável que as plantas cultivadas em meio adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose encontravam-se mais susceptíveis aos efeitos deletérios causados pelo estresse hídrico, não sendo capazes de realizar ajustamento osmótico.

Resultados ligeiramente diferentes foram encontrados por Braga (2011) trabalhando com *Pitcairnia albiflos*. Naquele trabalho, maior acúmulo de prolina foi

observado nos tecidos provenientes dos meios de cultura adicionados de 30 g L⁻¹ de sacarose, independentemente do regulador de crescimento utilizado *in vitro*, GA₃ ou ANA, tanto para materiais provenientes de plantas cultivadas *in vitro* por 140 dias quanto para tecidos extraídos de plantas após 70 dias de aclimatização.

Enquanto diversos aminoácidos são conhecidos por se acumularem em resposta ao estresse osmótico, a prolina aparentemente tem papel protetor específico na adaptação das células vegetais à falta de água e parece ser o principal osmólito orgânico em muitas plantas (Handa *et al.*, 1986). Nessas condições, a prolina pode atuar como mediadora do ajustamento osmótico, estabilizadora de estruturas subcelulares, como membranas e proteínas, varredora de radicais livres e tampão redox, bem como um dos principais constituintes de proteínas da parede celular (Hare & Cress, 1997; Nanjo *et al.*, 1999; Hoekstra *et al.*, 2001; Molinari *et al.*, 2004; 2007; Reddy *et al.*, 2004; Verslues & Sharma, 2010; Sharma *et al.*, 2011). Níveis elevados de biossíntese de prolina em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgênicas conferem maior tolerância ao estresse hiperosmótico, fornecendo evidências convincentes de uma relação de causa e efeito entre o conteúdo de prolina e a tolerância osmótica (Kavi Kishor *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2000).

Porém, nem sempre a inexistência de resposta positiva no acúmulo de prolina significa incapacidade de adaptação das plantas a condições estressantes. Esse comportamento pode refletir a predominância, nessas plantas, de estratégias alternativas de adaptação ao estresse (Delauney & Verma, 1993). Parece haver uma relação de reciprocidade entre o acúmulo de prolina e de outros osmólitos, o que sugere que eles podem compensar a falta de ativação da biossíntese de prolina. A seleção de diferentes mecanismos pode ser influenciada por padrões de alocação de nitrogênio e carbono, tamanho da planta e área de superfície total, características das raízes ou pelo equilíbrio hormonal e suas influências na fisiologia dos estômatos (Hare & Cress, 1997). Portanto, os resultados discrepantes, observados no presente estudo, não são surpreendentes, pois as condições de cultivo foram bastante diferentes entre os tratamentos utilizados, o que pode ter influenciado na escolha por uma ou outra estratégia de resistência ao estresse.

Al-Khayri & Al-Bahrany (2002) encontraram resultados similares aos obtidos no presente trabalho em cultivos *in vitro* de calos de arroz (*Oryza sativa*), nos quais ocorreram aumentos no acúmulo de prolina em resposta ao incremento da concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura até o máximo de 40 g L⁻¹. Concentrações mais elevadas de sacarose levaram ao aumento no acúmulo de prolina, o que foi

atribuído à intensificação do estresse osmótico nessas condições. Segundo Lokhande *et al.* (2010), o maior acúmulo de prolina observado em culturas de calos de *Sesuvium portulacastrum* submetidas a concentrações salinas crescentes foi fundamental para o ajustamento osmótico e manutenção do turgor celular.

Embora o perfil no acúmulo de prolina observado nos materiais mantidos *in vitro* tenha sido o mesmo após 180 dias de aclimatização, no presente trabalho não foram observadas diferenças para a concentração de sacarose entre os materiais já aclimatizados (Figura 5), o que sugere que as condições de cultivo *in vitro* não influenciam mais o estado hídrico dos tecidos das plantas após um prolongado período de aclimatização, pelo menos no que diz respeito ao acúmulo de prolina. Diferentemente do que foi encontrado com *P. albiflos* por Braga (2011), com o passar do tempo de aclimatização e com a crescente adaptação das plantas de *P. encholiroides* às condições *ex vitro*, as diferenças entre os tratamentos com relação ao acúmulo de prolina desapareceram.

Nas plantas submetidas à desidratação progressiva houve maior acúmulo de prolina com o aumento do tempo de desidratação, sendo esse acúmulo mais acentuado nos tecidos das plantas provenientes dos tratamentos contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ (Figura 17). O mesmo não aconteceu com materiais provenientes de meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, que não acumularam prolina significativamente com o passar do tempo de desidratação. Esses resultados reforçam a possibilidade de que plantas de *P. encholiroides* provenientes do cultivo *in vitro* em meio contendo a maior concentração de sacarose tenham apresentado melhor adaptação ao estresse hídrico, uma vez que o acúmulo de prolina é um indicativo de resposta adaptativa às condições de seca.

Resultados similares foram encontrados por Braga (2011) com *P. albiflos*, com acúmulo de prolina muito mais acentuado em plantas provenientes do cultivo *in vitro* na presença da concentração mais elevada de sacarose, o que pode ser considerado uma adaptação das plantas ao estresse hídrico. Diversos trabalhos relatam o acúmulo de prolina em diferentes espécies submetidas ao estresse osmótico em resposta ao déficit hídrico. *Oryza sativa* e *Alternanthera philoxeroides*, duas espécies com metabolismo similar, apresentaram acúmulo de prolina durante 30 dias de suspensão da irrigação (Gao *et al.*, 2008), o mesmo ocorrendo com quatro genótipos de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) (Silva *et al.*, 2009) e com seis espécies lenhosas da China (Liu *et al.*, 2011) submetidas às mesmas condições de estresse hídrico. A adição de sais ou de outras

substâncias osmoticamente ativas ao meio de cultivo também pode ser responsável pelo estresse hídrico das plantas e acarretar aumentos no teor de prolina, como observado para *Populus euphratica* cultivada em meio com concentrações crescentes de NaCl e manitol (Watanabe *et al.*, 2000), para arroz (*Oryza sativa*) submetido a choque salino (Basu *et al.*, 2002) e para *Sesuvium portulacastrum* cultivada em meio com NaCl (Lokhande *et al.*, 2011). O estresse hídrico moderado geralmente acarreta aumentos no teor de prolina, mas em situações de estresse severo pode haver decréscimos, como observado por Zheng *et al.* (2010) em quatro linhagens de nim (*Azadirachta indica*).

Após a reidratação, os teores de prolina nas plantas anteriormente submetidas à desidratação foram estatisticamente semelhantes ao controle, mantido sob irrigação periódica, independentemente da origem do material. Houve diminuição no conteúdo de prolina nos tecidos que haviam acumulado maiores quantidades desse aminoácido em resposta ao estresse hídrico, demonstrando que houve recuperação fisiológica das plantas após o restabelecimento do potencial hídrico dos tecidos (Figura 17).

Resultados similares foram encontrados por Braga (2011) com *P. albiflos* e com diferentes genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), nos quais houve intenso incremento nos teores de prolina após sete (Parida *et al.*, 2007) ou durante 14 dias de estresse hídrico (Parida *et al.*, 2008), havendo, todavia, redução até os níveis apresentados pelo controle após a reidratação. O mesmo ocorreu com quatro variedades de trigo submetidas a sete dias de estresse hídrico e a posterior reidratação, com elevação substancial dos teores de prolina nas plantas mantidas sob estresse e redução aos níveis do controle após recuperação hídrica (Simova-Stoilova *et al.*, 2008). Com mudas de andiroba (*Carapa guianensis*) submetidas a 27 dias de estresse hídrico houve incremento de cerca de 60% nos teores de prolina nos tecidos estressados, em relação ao material não submetido à desidratação, e queda posterior nos teores de prolina após reidratação, até alcançar valores similares aos apresentados pelas plantas irrigadas periodicamente e não submetidas ao estresse (Silva, 2009).

O acúmulo da prolina em tecidos osmoticamente estressados e sua rápida redução quando a tensão é removida é consistente com o papel desse aminoácido na recuperação das plantas do estresse. Isso ocorre pois o rápido catabolismo da prolina gera equivalentes redutores que suportam a fosforilação oxidativa mitocondrial, fornecendo energia para a célula durante essa etapa (Hare & Cress, 1997; Trovato *et al.*, 2008; Szabados & Saviouré, 2009). As células geralmente voltam ao padrão normal de crescimento após a remoção do estresse osmótico, continuando então seu

desenvolvimento. Em células sujeitas ao estresse hídrico, a adição de prolina exógena possui efeito estimulatório sobre o crescimento celular, o que também reforça a atuação benéfica da prolina no processo de recuperação fisiológica das plantas (Handa *et al.*, 1986; Sharma *et al.*, 2011).

Além de sua função no ajustamento osmótico, a prolina atua aumentando a resistência das plantas ao estresse hídrico de outras formas (Hare & Cress, 1997; Trovato *et al.*, 2008; Szabados & Saviouré, 2009). A redução na taxa de assimilação de CO₂ sob essa condição ambiental adversa resulta na exposição dos cloroplastos ao excesso de energia de excitação e aumenta a taxa de formação de EROs (Smirnov, 1993; Chaves *et al.*, 2009), o que é potencialmente prejudicial sob condições de estresse hídrico. Em cultura de células isoladas, diferentes formas de EROs podem causar inibição enzimática, degradação da clorofila, danos às moléculas orgânicas, inclusive o DNA, peroxidação e desesterificação intensa dos lipídeos de membrana (Hoekstra *et al.*, 2001; Apel & Hirt, 2004).

Molinari *et al.* (2007) observaram maior incremento no teor de prolina em tecidos foliares de cana de açúcar transgênica com o passar do tempo de desidratação, por um período de até 12 dias de estresse hídrico, e conseqüente menor aumento na peroxidação lipídica, um indicador de estresse oxidativo, além de menor redução dos níveis de clorofilas. Resultados similares foram encontrados em plantas de trigo transgênicas durante 15 dias de supressão da irrigação, com maior incremento nos teores de prolina em relação às plantas não modificadas, associado a menores níveis de peroxidação lipídica e menor decréscimo da taxa fotossintética (Vendruscolo *et al.*, 2007). Ambos os trabalhos sugeriram que a prolina tem um papel importante no sistema de proteção do metabolismo e age reduzindo os danos oxidativos causados pelo estresse hídrico, protegendo o aparelho fotossintético e aumentando a tolerância das plantas a essas condições. Mohammadkhani & Heidari (2008), trabalhando com duas variedades de milho, observaram acúmulo de prolina e a conseqüente diminuição do potencial hídrico do meio de cultivo, evidenciando, também, a importância desse aminoácido na redução dos danos oxidativos.

Dessa maneira, além de agir como mediadora do ajuste osmótico, a prolina possui a capacidade de proteger o aparato fotossintético pela varredura das EROs e/ou proteção e estabilização de enzimas varredoras de radicais livres e derivados, o que contribui ainda mais para a superação dos danos causados pelo déficit hídrico (Reddy *et al.*, 2004; Szabados & Saviouré, 2009; Xu *et al.*, 2009). Além disso, a função como

varredora de radicais livres pode ser mais importante do que simplesmente a de osmólito compatível (Hong *et al.*, 2000). Portanto, atuando como mediadora do ajustamento osmótico ou através dos seus processos de síntese e degradação, a prolina é considerada uma molécula de fundamental importância na adaptação das plantas às condições adversas, especialmente ao estresse osmótico causado pela falta de água nos tecidos vegetais (Handa *et al.*, 1986).

4.2 – Proteínas totais

No presente trabalho, o maior teor de proteínas encontrado nos tecidos das plantas provenientes dos tubos não vedados, independentemente da concentração de sacarose e do regulador de crescimento utilizados (Figura 6), pode ser explicado pela redução do conteúdo relativo de água desses tecidos durante os procedimentos de cultivo *in vitro*, havendo, como consequência, maiores quantidades de proteínas totais por unidade de massa seca. Nos tecidos provenientes de tubos vedados, o elevado conteúdo relativo de água no ambiente e nos tecidos resultou em menor peso de massa seca e, conseqüentemente, em menor conteúdo de proteínas totais.

Teores reduzidos de proteínas totais também podem ser resultado do estresse oxidativo que ocorre nas plantas mantidas em tubos hermeticamente vedados. Nessas condições, há aumento na produção de EROs, o que acarreta uma série de alterações nas estruturas das proteínas, como, por exemplo, a oxidação dos resíduos de aminoácidos nas cadeias laterais e ligações indesejadas proteína-proteína, aumentando a sensibilidade à proteólise e provocando fragmentação proteica (Berlett *et al.*, 1997). O mesmo raciocínio pode ser usado para explicar os maiores teores de proteínas totais encontrados no material após aclimatização, em relação aos tecidos mantidos *in vitro*.

In vitro, as diferentes concentrações de sacarose utilizadas apresentaram efeitos significativos somente nos materiais vedados, havendo maior teor de proteínas totais nos tecidos das plantas provenientes dos meios adicionados da maior concentração de sacarose (Figura 6). Esse resultado pode ser resultante do maior efeito osmótico da concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, reduzindo o conteúdo relativo de água dos tecidos (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2002). Além disso, a sacarose apresenta efeitos diretos no desenvolvimento das plantas *in vitro*, como observado por Arigita *et al.* (2010),

trabalhando com plantas de kiwi (*Actinidia deliciosa*). Nesse trabalho, os autores encontraram 90% de absorção da sacarose inicialmente adicionada, em um meio de cultura suplementado com apenas 10 g L⁻¹ desse carboidrato, indicando que a sacarose, nessa concentração, foi insuficiente para garantir o crescimento e o desenvolvimento das plantas, o que foi evidenciado pelo menor desenvolvimento das folhas e pelo menor aumento do peso da massa seca, além da ocorrência de brotações em número e tamanho menores. A adição de maiores concentrações de sacarose beneficiou o desenvolvimento das plantas de kiwi, pois esse carboidrato é fonte de energia e de carbono para a síntese de compostos celulares.

Em contraste, plantas de batata (*Solanum tuberosum*) cultivadas em meio isento de sacarose apresentaram maior crescimento e desenvolvimento da parte aérea, além de maior taxa fotossintética, que plantas cultivadas em meio suplementado com sacarose, em um sistema com umidade relativa baixa (50 ± 5%) e irradiância mais elevada (150 μmol m⁻² s⁻¹) que nos padrões normais de cultivo *in vitro* (Badr *et al.*, 2011). Esses resultados evidenciam que, dependendo de determinados fatores do ambiente de cultivo, a adição de sacarose pode ou não ser benéfica para o desenvolvimento *in vitro* das culturas.

No ensaio de desidratação progressiva, aumentos significativos nos teores de proteínas totais foram observados em resposta ao prolongamento do estresse hídrico, independentemente da procedência das plantas utilizadas (Figura 18), o que pode ser explicado pela redução no conteúdo relativo de água nos tecidos e o consequente acúmulo de matéria seca, além do efeito de fragmentação proteica que ocorre devido ao estresse oxidativo (Berlett *et al.*, 1997). Resultados similares foram encontrados para plantas de *Momordica charantia* mantidas sob estresse hídrico por até três dias (Agarwal & Shaheen, 2007) e para sete genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) cultivados sob condições crescentes de déficit hídrico, havendo maior acúmulo de proteínas nos tecidos mantidos sob estresse mais intenso (Hameed *et al.*, 2011). Em contraste, quatro genótipos de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) submetidos à suspensão da irrigação por intervalos intermitentes não apresentaram variação no conteúdo de proteínas solúveis totais em resposta ao prolongamento do estresse hídrico (Silva *et al.*, 2009).

Após o período de reidratação houve redução nos teores de proteínas acumuladas em resposta ao estresse hídrico, alcançando os valores apresentados pelo grupo controle (Figura 18). Resultados similares foram obtidos por Parida *et al.* (2007)

para dois genótipos de algodoeiro, nos quais eles verificaram redução nos teores de proteínas após sete dias de estresse hídrico, havendo a recuperação dos níveis apresentados pelo grupo controle após sete dias de reidratação.

4.3 – Enzimas

A desintoxicação das EROs é feita tanto por mecanismos de varredura não enzimáticos quanto por mecanismos enzimáticos (Kibinza et al., 2011), que incluem enzimas capazes de remover, neutralizar ou varrer radicais livres e seus intermediários, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO), que atuam como um dos principais mecanismos de tolerância aos estresses oxidativos nas plantas (Scandalios, 1993; Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004; Batková et al., 2008; Lokhande et al., 2010; Zheng et al., 2010).

Nos ensaios realizados com as plantas mantidas *in vitro*, as atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) foram maiores nos tecidos provenientes dos tubos de ensaio suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose, independentemente do regulador de crescimento e do tipo de vedação utilizados (Figuras 7 e 8). Como essas duas enzimas de varredura de EROs apresentaram maiores atividades, os resultados observados sugerem maior produção de radicais livres nos tecidos mantidos nos tubos com a menor concentração de sacarose, havendo, portanto, a necessidade de maior atividade enzimática antioxidativa na tentativa de neutralizar os radicais livres formados.

A SOD é considerada a primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo, por converter $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 (Fridovich, 1995; Alscher, 2002). Em seguida, a catalase (CAT) atua na redução do H_2O_2 a H_2O , evitando a conversão do peróxido de hidrogênio em radicais mais reativos, como o OH^{\cdot} (Perl-Treves & Perl, 2002; Bienert et al., 2006). *CATs e SODs são as enzimas mais eficientes do metabolismo antioxidativo, uma vez que suas ações combinadas convertem os potencialmente perigosos radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2), evitando assim os danos celulares (Scandalios, 1993).* Vários trabalhos apontam a SOD e a CAT como as principais enzimas varredoras de radicais livres em resposta ao estresse osmótico (Reddy et al., 2004). Saher et al. (2005) observaram aumentos

consideráveis nas atividades da SOD e CAT após 14 e 28 dias de cultivo *in vitro* para três variedades de *Dianthus caryophyllus* cultivadas em meio indutor de hiperidricidade, encontrando correlação positiva entre esses fatores.

No presente trabalho, a polifenol oxidase (PPO) também apresentou maiores atividades nos tecidos mantidos em meio de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose, porém somente em meio suplementado com ANA, independentemente do tipo de vedação, não havendo, entretanto, diferenças significativas nos meios adicionados de GA₃ (Figura 10). A peroxidase (POD) foi a única enzima que apresentou comportamento distinto, exibindo maiores atividades nos tecidos das plantas mantidas em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, independentemente do tipo de vedação dos tubos de ensaio e do regulador de crescimento utilizado (Figura 9).

O acúmulo de prolina possui íntima relação com as enzimas envolvidas na varredura de ROS, podendo promover ou inibir suas atividades. Ozden *et al.* (2009), estudando os efeitos da adição de prolina exógena ao sistema antioxidativo de folhas de videira (*Vitis vinifera*) submetidas ao estresse oxidativo por H₂O₂, encontraram menores atividades da SOD e da CAT em presença desse aminoácido, com menores níveis de peroxidação lipídica, porém maior atividade da POD, resultados similares aos encontrados no presente trabalho.

Dessa forma, as maiores atividades da SOD e da CAT em meio contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e as maiores atividades da POD em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose poderiam ser explicadas pelo efeito direto do acúmulo de prolina sobre as atividades dessas enzimas. Devido ao acúmulo preferencial desse aminoácido nos tecidos mantidos em tubos com a maior concentração de sacarose e sua atuação como molécula varredora de EROs, haveria menor necessidade de ativação de outros sistemas antioxidativos, principalmente das enzimas iniciais da via antioxidativa, SOD e CAT. Contudo, vias secundárias de varredura poderiam ser ativadas, como é o caso da POD.

Com relação ao tipo de vedação, houve, em geral, aumentos nas atividades da SOD e da CAT nos materiais mantidos nos tubos vedados (Figuras 7 e 8), onde a umidade relativa do ar se encontra próxima a 100% e há ocorrência de maior estresse oxidativo. Tendência contrária foi observada para a PPO, com menores atividades nos tecidos provenientes dos tubos vedados, não sendo encontradas diferenças significativas na atividade da POD entre os materiais vedados e não vedados (Figuras 9 e 10). Devido principalmente ao aumento nas atividades da CAT e SOD em tecidos de plantas mantidas *in vitro* em tubos hermeticamente vedados, sugere-se que a vedação hermética

dos tubos de ensaio é prejudicial ao metabolismo das plantas, ocasionando maior produção de EROs e ativação das principais vias de varredura enzimática.

A concentração de CO₂ exerce influência direta sobre a atividade das enzimas antioxidantes, como a CAT, por exemplo. Haver & McHale (1989), trabalhando com folhas de tabaco (*Nicotiana sylvestris*), observaram redução na atividade da CAT em atmosfera enriquecida com CO₂ e o retorno da atividade enzimática a níveis normais quando as plantas foram transferidas de volta à atmosfera com menor concentração de CO₂. Como geralmente nos tubos vedados há menor quantidade de CO₂ durante o período luminoso, o aumento da atividade da CAT é um indicativo do maior estresse oxidativo sofrido pelas plantas mantidas em tubos hermeticamente vedados.

Quanto à comparação das atividades enzimáticas entre os materiais mantidos em meios adicionados dos diferentes reguladores de crescimento, houve maior atividade da POD e da PPO em meios contendo GA₃. A CAT apresentou maior atividade em meio suplementado com ANA e para a SOD não houve uniformidade na resposta (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Resultados distintos foram encontrados por Braga (2011), trabalhando com *P. albiflos*. Naquele trabalho, as atividades da CAT, POD e PPO foram maiores nos tecidos das plantas mantidas *in vitro* em tubos de ensaio fechados com tampas vedadas, não havendo diferenças na atividade da SOD. Foram encontradas maiores atividades enzimáticas nos meios contendo GA₃, em relação aos meios com ANA, exceto para PPO. Esses resultados divergentes não surpreendem, pois o nível de alteração nas atividades das enzimas antioxidantes nos tecidos das plantas sob estresse hídrico é extremamente variável entre as espécies e até mesmo entre cultivares de uma mesma espécie. O nível de resposta depende também dos estádios de desenvolvimento e metabólico da planta, bem como da duração e intensidade do estresse (Bray, 1997; Reddy *et al.*, 2004; Simova-Stoilova *et al.*, 2008).

A aclimatização *ex vitro* das plantas é um fator limitante para o sucesso dos protocolos de micropropagação. Ao sair das condições impostas pelo crescimento *in vitro*, várias modificações morfofisiológicas ocorrem em resposta às novas condições, demandando incremento na absorção de nutrientes, realização de fotossíntese, proteção contra organismos potencialmente patogênicos e aumento da taxa de transpiração, situações que podem levar ao estresse oxidativo em resposta ao aumento na geração de EROs (Grattapaglia & Machado, 1998). Em função disso, a atuação das enzimas

antioxidativas é de fundamental importância para a sobrevivência das plantas ao transplântio.

Até recentemente eram limitadas as informações sobre o possível papel dos sistemas de proteção enzimáticos durante o processo de aclimatização de plântulas micropropagadas. Porém, diversos trabalhos têm sido publicados desde então, alguns deles relatando as oscilações que ocorrem nas atividades das enzimas do metabolismo antioxidativo em resposta ao estresse hídrico proveniente desse processo (Van Huylbroeck et al., 2000; Batková et al., 2008; Faisal & Anis, 2009).

No presente trabalho as atividades da CAT, POD e PPO foram maiores nos materiais provenientes de plantas mantidas in vitro, em comparação aos de plantas já aclimatizadas, não sendo observada uma resposta uniforme com relação à SOD (Figuras 7, 8, 9 e 10). Resultados distintos podem ser encontrados na literatura. Van Huylbroeck et al. (2000), trabalhando com Calathea louisae, observaram atividade da CAT nitidamente maior após aclimatização, mas com a SOD eles não encontraram uma tendência clara. Para uma espécie do gênero Musa, de maneira geral, houve aumento na atividade da SOD e da CAT entre o 3º e o 5º dia após o transplântio para condições ex vitro, ocorrendo queda nas atividades enzimáticas após o sétimo dia e estabilização posterior em um estado de baixa atividade (Aragón et al., 2010). Para Rauvolfia tetraphylla, a SOD apresentou aumento na atividade após a primeira semana de aclimatização, havendo queda no período seguinte, e para a CAT observou-se o contrário, ou seja, uma redução seguida de aumento na atividade (Faisal & Anis, 2009). As análises foram realizadas semanalmente durante 28 dias após a transferência das plantas para condições ex vitro.

Nas plantas aclimatizadas em casa de vegetação, em geral, as atividades da CAT, POD e PPO foram significativamente menores nos tecidos provenientes das plantas mantidas in vitro em meios de cultura adicionados de 30 g L⁻¹ de sacarose, em meio suplementado com ANA (Figuras 8, 9 e 10). Para a SOD, apesar de ter havido certa tendência de aumento da atividade na maior concentração de sacarose, os dados foram estatisticamente semelhantes, independentemente do tipo de vedação (Figura 7). Em meio com GA₃, houve tendência de aumento nas atividades da CAT, POD e SOD nos tecidos provenientes dos meios contendo a maior concentração de sacarose, embora, em alguns casos, não significativamente. Para a PPO os dados foram similares estatisticamente. Percebeu-se, portanto, uma nítida diferença nas atividades enzimáticas entre os dois reguladores de crescimento utilizados, fato esse que não foi observado para

P. albiflos (Braga, 2011), em que as atividades das enzimas após aclimatização foram, em geral, mais baixas ou sem diferenças significativas em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, independentemente do regulador de crescimento e do tipo de vedação utilizados.

Na maioria dos casos, a vedação hermética dos tubos de ensaio durante o cultivo *in vitro* se mostrou prejudicial para o desenvolvimento das plantas, sendo esse efeito também observado para os materiais após aclimatização. Em geral, as atividades enzimáticas se mostraram maiores nas plantas oriundas dos tubos vedados, em comparação aos que permitiam trocas gasosas, demonstrando maior capacidade de adaptação e aclimatização das plantas cultivadas *in vitro* em tubos não vedados (Figuras 7, 8, 9 e 10). De modo contrário, para *P. albiflos*, o tipo de tampa não influenciou significativamente a atividade enzimática durante a aclimatização (Braga, 2011).

No presente trabalho, em geral, houve redução nas atividades da CAT, SOD, POD e PPO com o prolongamento do estresse hídrico, ou os resultados permaneceram similares estatisticamente, com exceção da atividade da POD em meio com 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃, no qual houve um aumento considerável na atividade enzimática (Figuras 19, 20, 21 e 22). As maiores reduções ocorreram em tecidos provenientes de plantas cultivadas *in vitro* em meio contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA, com exceção da SOD, indicando que a menor concentração de sacarose adicionada ao meio de cultivo *in vitro* pode apresentar um efeito residual considerável e prejudicial no desenvolvimento posterior das plantas, fazendo com que elas sejam menos resistentes ao estresse hídrico. Braga (2011) encontrou resultados similares com *P. albiflos*, evidenciando maior sensibilidade dos materiais cultivados em meio com a menor concentração de sacarose.

Na literatura, a maioria dos trabalhos menciona aumentos nas atividades das enzimas antioxidativas em resposta ao estresse hídrico. Para plantas de *Momordica charantia* submetidas a três dias de falta de água, houve aumento nas atividades da SOD, CAT e POD e redução na atividade da PPO (Agarwal & Shaheen, 2007). Sajedi *et al.* (2011) observaram aumento nas atividades da SOD e CAT em tecidos de plantas de milho mantidas sob supressão da irrigação. Ennajeh *et al.* (2009), trabalhando com dois cultivares de oliveira (*Olea europaea*) apresentando resistência diferencial ao estresse hídrico, observaram em ambos aumentos nas atividades da CAT e POD em resposta à desidratação do tecido foliar.

As atividades enzimáticas podem oscilar em resposta ao estresse hídrico, podendo haver aumentos da atividade nos tecidos em situações de estresse moderado e reduções sob estresse severo. Esse comportamento foi observado para a CAT, POD e SOD em plantas de *Oryza sativa* e *Alternanthera philoxeroides* durante 30 dias de suspensão da irrigação (Gao *et al.*, 2008), com sete genótipos de trigo (Hameed *et al.*, 2011) e seis espécies lenhosas da China (Liu *et al.*, 2011) submetidas a níveis crescentes de déficit hídrico, assim como para a SOD e POD em quatro linhagens de nim (*Azadirachta indica*) mantidas sob déficit hídrico (Zheng *et al.*, 2010). Percebe-se, portanto, que os efeitos do estresse hídrico sobre as plantas dependem da intensidade e da duração do estresse (Simova-Stoilova *et al.*, 2008), podendo ocorrer comportamentos distintos à medida que essas variáveis se modificam.

Abogadallah (2011), trabalhando com a espécie *Pancreaticum maritimum*, observou redução significativa nas taxas de fotossíntese e de transpiração em plantas submetidas a períodos de 11 e 21 dias de estresse hídrico, bem como em plantas submetidas a concentrações crescentes de NaCl, em relação aos respectivos grupos controle, sem estresses hídrico e salino, havendo aumento significativo nas atividades da CAT e POD com o passar do tempo de desidratação. Em cultivo *in vitro* de *Sesuvium portulacastrum*, Lokhande *et al.* (2010) observaram decréscimo significativo na atividade da CAT em resposta ao estresse hídrico causado por adição de NaCl ao meio de cultura, e tendência de aumento na atividade da SOD, embora não tão evidente. Em um trabalho posterior com a mesma espécie e sob o mesmo tipo de estresse, aumentos significativos na atividade da SOD foram evidenciados (Lokhande *et al.*, 2011).

Hu *et al.* (2010) observaram aumentos significativos nas atividades da SOD nos seus principais locais de ocorrência, cloroplastos, mitocôndria e citosol, após estresse hídrico causado por um período de cinco dias de suspensão da irrigação, em dois cultivares de pimenta (*Capsicum annum*). Yang *et al.* (2010) encontraram aumento significativo nas atividades da SOD e da CAT em decorrência do estresse hídrico causado pela adição de concentrações crescentes de NaCl, e decréscimo na atividade da POD, em cultivos de calos da halófito *Nitraria tangutorum*.

Após a reidratação das plantas de *P. encholirioides*, não foram encontradas diferenças entre o grupo controle, não submetido ao estresse hídrico, e os demais tratamentos (Figuras 19, 20, 21 e 22). As atividades enzimáticas foram estatisticamente semelhantes, independentemente do tempo de desidratação e da origem do material, o que sugere uma elevada capacidade de adaptação das plantas dessa espécie às condições

de estresse e de recuperação após a retirada do agente estressante. O mesmo não aconteceu com *P. albiflos*, que apresentou menor recuperação das atividades enzimáticas após a reidratação (Braga, 2011).

4.4 – Pigmentos

Com relação aos teores de pigmentos (clorofilas *a* e *b*, clorofilas e carotenoides totais), os resultados evidenciaram, em geral, menor acúmulo nos tecidos das plantas mantidas *in vitro* em tubos de ensaio vedados, principalmente nos meios de cultivo adicionados de ANA, nos quais os valores foram significativamente menores (Figuras 11 e 12). Observou-se, dessa forma, que a vedação dos tubos de ensaio foi prejudicial ao desenvolvimento autotrófico das plantas, causando menor proteção do aparato fotossintético, uma vez que houve menor produção de pigmentos fotossintéticos e de carotenoides. Essa mesma resposta foi observada por Braga (2011) com plantas de *P. albiflos*.

De maneira geral, houve maior acúmulo de pigmentos nos tecidos provenientes de meios adicionados da maior concentração de sacarose em relação à menor, em meio contendo GA₃, ocorrendo exatamente o contrário nos materiais adicionados de ANA, nos quais os valores foram significativamente menores, independentemente do tipo de vedação (Figuras 11 e 12). Essas diferenças de comportamento não permitiram uma generalização quanto aos efeitos das diferentes concentrações de sacarose sobre a produção dos pigmentos fotossintéticos, embora, na literatura, seja relatado que a presença desse carboidrato nos meios de cultivo inibe especificamente a formação das clorofilas, tornando menos viável o crescimento autotrófico por diminuir a taxa fotossintética das plantas (George *et al.*, 2008). Em contraste, os efeitos da vedação hermética se mostraram prejudiciais em todos os casos, independentemente da concentração de sacarose e do regulador de crescimento utilizados, levando à menor produção dos pigmentos fotossintéticos. Diferenças no acúmulo de pigmentos em resposta à variação na concentração de sacarose entre tecidos provenientes de meios adicionados de diferentes reguladores de crescimento também foram observadas por Braga (2011) em trabalho com *P. albiflos*.

Mohamed & Alsdon (2010), estudando uma espécie de batata, não observaram diferenças significativas para o conteúdo de clorofila *a* entre materiais provenientes de dois sistemas de vedação, ventilados e não ventilados, em nenhuma das três concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultivo (10, 20 ou 30 g L⁻¹). A concentração mais elevada de sacarose afetou negativamente o teor de clorofila *a*, sendo a concentração intermediária aquela que melhor promoveu a síntese desse pigmento. A resposta para a clorofila *b* foi diferente, não havendo efeitos da concentração de sacarose, embora a ventilação dos frascos de cultura tenha afetado positivamente os teores desse pigmento.

De maneira geral, comparando-se os efeitos da concentração de sacarose, não foram encontradas diferenças na relação clorofila *a*/clorofila *b* entre os tecidos das plantas cultivadas em meio com GA₃, havendo menores conteúdos em meio adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, em relação à menor concentração, em presença de ANA. Para a relação clorofilas totais/carotenoides totais, menores valores foram encontrados nos tecidos provenientes de tubos não vedados em relação aos vedados somente em meio adicionado da maior concentração de sacarose (Figura 13). Contrariamente, Braga (2011) não encontrou diferenças nas relações clorofila *a*/clorofila *b* e clorofilas totais/carotenoides totais entre os tratamentos, tanto para as condições de cultivo *in vitro* quanto para as condições *ex vitro*.

Diferentemente do que foi relatado por Braga (2011), no presente estudo não foram observadas diferenças no acúmulo de pigmentos e nas relações clorofila *a*/clorofila *b* e clorofilas totais/carotenoides totais entre os tratamentos, após a aclimatização *ex vitro* (Figuras 11, 12 e 13). Esses resultados sugerem que após um longo período de manutenção das plantas em casa de vegetação, as influências das condições de cultivo *in vitro* sobre esses parâmetros podem se perder.

Gour *et al.* (2007) consideram o conteúdo de clorofilas um dos parâmetros mais importantes para a determinação do estágio adequado de endurecimento das plantas após aclimatização. Para esses autores, quando o conteúdo de clorofilas em plantas oriundas de cultivo *in vitro* alcança 95% dos valores encontrados em plantas mantidas em ambiente natural, elas podem ser consideradas suficientemente endurecidas para sobreviverem em condições de campo.

Os carotenoides também são pigmentos fundamentais na proteção do aparelho fotossintético contra os danos causados pelo estresse hídrico. Eles fazem parte dos sistemas de defesa antioxidantes não-enzimáticos, atuando na proteção dos

fotossistemas pela captura do excesso de energia das clorofilas no estado excitado, prevenindo, conseqüentemente, a formação de EROs (Perl-Treves & Perl, 2002; Pospíšilová *et al.*, 2009). Ademais, as *condições de crescimento e diversos fatores ambientais podem modificar a razão clorofila a/clorofila b* (Lichtenthaler, 1987). Assim como observado por Braga (2011), no presente trabalho houve redução no conteúdo dos pigmentos e das relações entre eles em alguns tratamentos após o período de aclimatização, em relação ao material mantido *in vitro*. Essa redução ocorreu principalmente nos tecidos provenientes dos meios adicionados de GA₃, sendo que nos meios suplementados com o ANA houve aumentos nos conteúdos de pigmentos, principalmente nos materiais vedados (Figuras 11, 12 e 13).

Os teores de clorofilas podem ser maiores ou menores nas folhas das plantas *in vitro* do que nas plantas após aclimatização, dependendo de fatores como irradiância, composição do meio de cultivo e da concentração de CO₂ (Pospíšilová *et al.*, 2009). Além disso, o tipo de folha utilizado nas análises também influencia os resultados. As folhas persistentes geralmente apresentam queda nos teores de pigmentos após aclimatização, mas as folhas novas que surgem após esse processo tendem a acumular mais clorofilas e carotenoides (Van Huylenbroeck *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001). Faisal & Anis (2009), trabalhando com *Rauvolfia tetraphylla*, observaram aumentos nos teores de clorofilas *a* e *b* nas folhas novas formadas após a transferência das plantas, com o passar do tempo de aclimatização, durante 28 dias após a transferência das plantas para condições *ex vitro*. Após os primeiros sete dias houve diminuição nos teores de carotenoides em relação ao material *in vitro*, havendo aumento linear a partir desse ponto. O genótipo da planta também pode influenciar o comportamento dos pigmentos. Borghezani *et al.* (2003), trabalhando com seis genótipos de videira (*Vitis* spp.), observaram em dois deles maior teor de clorofilas totais nos tecidos das plantas ainda *in vitro* em comparação ao material aclimatizado em casa de vegetação, ocorrendo o contrário com os outros quatro genótipos. Os efeitos de diferentes sistemas de vedação, hermético e não-hermético, sobre o crescimento *in vitro* e sobre o conteúdo de clorofilas também foram avaliados por Chanemougasoundharam *et al.* (2004). Plântulas cultivadas em frascos fechados hermeticamente apresentaram peso fresco elevado (hiperhidricidade), diversas anormalidades morfológicas, alto índice de senescência e teores de clorofila reduzidos, o que é bastante prejudicial à aclimatização em condições *ex vitro*.

Com relação ao experimento de desidratação, nos quais as plantas foram submetidas ao estresse hídrico, houve acúmulo de pigmentos em resposta ao prolongamento do déficit hídrico nos tecidos das plantas cultivadas *in vitro* em meios adicionados de 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃, ocorrendo oscilações nos materiais provenientes de meios de cultura contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA (Figuras 23 e 24). Esses resultados podem ser explicados pela maior redução no conteúdo relativo de água nos tecidos provenientes de plantas mantidas *in vitro* em meio adicionado da maior concentração de sacarose, o que exigiu a utilização de uma maior quantidade de tecidos frescos para a obtenção da mesma massa foliar utilizada no ensaio de determinação do conteúdo de pigmentos, fato esse reforçado pelo maior incremento nos teores de proteínas totais, também observado nessas condições de desidratação.

Apesar de a redução nos teores de pigmentos fotossintéticos, resultante da queda na síntese e/ou do aumento na degradação, ser um sintoma típico do estresse oxidativo (Smirnoff, 1993), diferentes resultados podem ser encontrados na literatura (Jaleel *et al.*, 2009). Em alguns estudos o estresse hídrico não influenciou significativamente o conteúdo de pigmentos, como observado por Ashraf & Iram (2005), trabalhando com duas espécies de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* e *Sesbania aculeata*) submetidas a 45 dias de déficit hídrico, assim como por Braga (2011), com *P. albiflos*. Contrariamente, Parida *et al.* (2007) encontraram diminuição significativa no conteúdo de clorofilas e carotenoides totais após um período de sete dias de estresse hídrico, além de redução na relação clorofila *a*/clorofila *b*, trabalhando com dois genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) diferencialmente tolerantes à seca. Em trabalho similar, também com diferentes genótipos de algodoeiro, resultados semelhantes foram encontrados após o mesmo período de estresse hídrico (Shah *et al.*, 2011). Para *Momordica charantia* (Agarwal & Shaheen, 2007) e para seis espécies de plantas lenhosas da China (Liu *et al.*, 2011), os estudos também evidenciaram redução significativa nos conteúdos desses pigmentos com o aumento da intensidade do estresse hídrico.

Zheng *et al.* (2010) observaram redução nos teores de clorofilas *a*, *b*, clorofilas totais e na relação clorofila *a/b* em resposta ao estresse hídrico em quatro linhagens de nim (*Azadirachta indica*). Para 15 genótipos de algodoeiro submetidos a sete dias sem irrigação também houve redução nos teores de clorofilas *a* e *b* e de carotenoides e, contrariamente, aumentos na relação clorofila *a/b* (Shah *et al.*, 2011). Já Li *et al.* (2011), trabalhando com a leguminosa *Campylotropis polyantha*, encontraram aumentos nos

teores de clorofilas *a*, *b*, totais e carotenoides totais com o prolongamento do estresse hídrico, e diminuição da relação clorofila *a/b*.

Após a reidratação das plantas que foram submetidas ao estresse hídrico, as diferenças encontradas entre os tratamentos tenderam a desaparecer, e os valores encontrados para os conteúdos de pigmentos foram, de maneira geral, semelhantes ao do controle, não submetido à desidratação (Figuras 23, 24 e 25). Esse fato demonstra que os efeitos prejudiciais da deficiência de água tendem a ser revertidos quando as plantas voltam a receber irrigação periódica. Resultados similares foram encontrados por Parida *et al.* (2007) após sete dias de reidratação das plantas anteriormente desidratadas, com o recuperação dos teores de pigmentos (clorofila e carotenoides totais) em níveis semelhantes aos apresentados pelo grupo controle.

4.5 – Carboidratos

No presente trabalho houve, em geral, aumentos no acúmulo de carboidratos solúveis totais, sacarose e açúcares redutores com o prolongamento do período de desidratação, independentemente da origem do material (Figuras 26, 27 e 28). Com relação ao amido, não foram encontradas diferenças significativas entre o controle e os demais tratamentos, no material proveniente de meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃, havendo aumento gradual no acúmulo em tecidos provenientes de meios contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e ANA (Figura 29).

Apesar de o acúmulo de solutos, dentre eles os carboidratos, estar relacionado ao processo de regulação osmótica e manutenção do potencial hídrico celular em períodos de seca (Seki *et al.*, 2007), resultados distintos podem ser encontrados na literatura. Maia *et al.* (2007), trabalhando com duas variedades de milho (*Zea mays*) submetidas a cinco dias de estresse hídrico, observaram aumentos significativos nos teores de carboidratos solúveis totais nas plantas estressadas, em relação ao controle. O mesmo foi observado para a espécie halófito *Sesuvium portulacastrum*, submetida ao estresse osmótico por adição de concentrações crescentes de NaCl (Lokhande *et al.*, 2010). Ao contrário, Silva *et al.* (2009) observaram queda significativa nos teores de carboidratos solúveis totais em tecidos de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) submetidos ao estresse hídrico por suspensão da irrigação.

Garg *et al.* (2001) observaram aumento gradual nos teores de carboidratos solúveis totais e açúcares redutores por um período de até 9 dias de estresse hídrico em uma espécie de leguminosa (*Vigna aconitifolia*), havendo, ao mesmo tempo, redução significativa nos teores de amido. Resultados similares foram encontrados para diferentes genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) submetidos ao estresse hídrico (Marur, 1998; Parida *et al.*, 2007) e para plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum*) submetidas à restrição hídrica (Chaves-Filho & Stacciarini-Seraphin, 2001). Para dois cultivares de oliveira (*Olea europaea*) com resistência diferencial ao estresse hídrico, houve acúmulo de diferentes açúcares envolvidos tanto na osmorregulação quanto na osmoproteção de componentes celulares em condições de déficit hídrico severo (Ennajeh *et al.*, 2009).

Girardi & Pescador (2010), trabalhando com gengibre (*Zingiber officinale*), observaram maiores teores de amido nos tecidos mantidos *in vitro*, em relação ao material aclimatizado após 60 dias em casa de vegetação, havendo, portanto, redução em situação de estresse hídrico. Nesse caso, a aclimatização foi o agente causador do estresse, uma vez que as plantas perderam grande quantidade de água devido às anormalidades morfológicas, anatômicas e fisiológicas que ocorreram sob condições de cultivo *in vitro*, impossibilitando a manutenção do potencial hídrico após a transferência para um local com menor umidade relativa do ar. Esses autores também observaram aumentos nos teores de carboidratos solúveis totais concomitantemente à redução nos teores de amido, o que também foi encontrado por Mohammadkhani & Heidari (2008) para duas variedades de milho sob condições de estresse hídrico causado pela adição de diferentes concentrações de polietileno glicol (PEG).

A resposta de redução observada nos teores de amido, com incremento paralelo nos teores de carboidratos solúveis em situações de estresse hídrico, é associada na literatura aos efeitos da enzima amilase (Chaves-Filho & Stacciarini-Seraphin, 2001). Essa resposta, também observada por Braga (2011) para *P. albiflos*, não foi encontrada no presente trabalho, que evidenciou aumentos ou manutenção dos níveis de amido em resposta ao prolongamento do estresse hídrico, o que possivelmente ocorreu em resposta à manutenção da taxa fotossintética nas plantas de *P. encholirioides*, havendo, assim, menor necessidade de catálise desse carboidrato de reserva para obtenção de energia.

A seca pode resultar em alterações na relação dos produtos finais da fotossíntese, amido e sacarose, uma vez que a taxa de síntese de sacarose e de quebra de amido são

influenciadas pelo déficit hídrico (Reddy *et al.*, 2004). Portanto, os resultados encontrados no presente trabalho podem ser evidência de uma possível maior tolerância ao estresse hídrico de plantas de *P. encholirioides* em comparação a *P. albiflos*, pelo menos no que se refere à manutenção das taxas fotossintéticas.

Após a reidratação, os teores de carboidratos solúveis totais, sacarose, açúcares redutores e amido, observados nos tratamentos submetidos ao estresse hídrico, foram estatisticamente semelhantes ao controle, mantido sob irrigação periódica (Figuras 26, 27, 28 e 29), o que sugere a recuperação metabólica do material após a reidratação, independentemente da sua origem, evidenciando elevada capacidade de tolerância de plantas de *P. encholirioides* à desidratação. Resultados similares foram encontrados por Parida *et al.* (2007), que também observaram recuperação dos níveis de carboidratos solúveis totais, açúcares redutores e amido após a reidratação de plantas de algodão previamente submetidas ao estresse hídrico.

5 – Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- O cultivo *in vitro* de *P. encholirioides* em meio de cultura adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e ANA proporcionou melhores resultados quanto ao acúmulo de prolina. Além disso, as maiores atividades da SOD, CAT e PPO em materiais provenientes de meios de cultura contendo a menor concentração de sacarose sugeriram maior estresse oxidativo e necessidade de ativação mais intensa das enzimas antioxidativas, o que, provavelmente, teria como consequência, uma menor sobrevivência caso as plantas procedentes desses tratamentos fossem transferidas diretamente para o campo. A vedação hermética dos tubos de ensaio também se mostrou prejudicial, aumentando as atividades da SOD e CAT e, principalmente, reduzindo o acúmulo de pigmentos fotossintéticos.

- Após aclimatização *ex vitro*, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos para a maioria dos parâmetros analisados ou, então, os dados oscilaram de maneira a não permitir uma generalização quanto aos efeitos residuais da sacarose utilizada durante o cultivo *in vitro*.

- Plantas provenientes do cultivo *in vitro* em meio de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e GA₃ apresentaram maior tolerância à desidratação, devido, principalmente, ao maior acúmulo de prolina e proteínas solúveis totais, menor redução e/ou manutenção nas atividades enzimáticas, além do aumento nos teores de pigmentos fotossintéticos durante o período de estresse hídrico.

- Após a reidratação, as plantas demonstraram elevada capacidade de recuperação, apresentando, em todas as análises realizadas, valores similares aos do controle, não submetido à desidratação.

- O cultivo *in vitro* em meio de cultura adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e em recipientes que permitem trocas gasosas é o mais indicado, resultando em alterações metabólicas menos intensas nessa etapa da micropropagação. Sob essas condições, as plantas de *P. encholirioides* apresentariam maior resistência ao transplante e, provavelmente, maior sobrevivência a períodos prolongados de estresse hídrico, aos quais, frequentemente, estão submetidas no ambiente natural.

6 – Referências Bibliográficas

- Abogadallah, G. M. Differential regulation of photorespiratory gene expression by moderate and severe salt and drought stress in relation to oxidative stress. *Plant Science*, 180: 540-547, 2011.
- Agarwal, S. & Shaheen, R. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19: 149-161, 2007.
- Al-Khayri, J. M. & Al-Bahrany, A. M. Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose-induced osmotic stress in rice. *Biologia Plantarum*, 45: 609-611, 2002.
- 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.
- Anderson, M. D.; Prasad, T. K.; Stewart, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109: 1247-1257, 1995.
- Apel, K & Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399, 2004.
- Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M.; Amâncio, S. *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. *Biologia Plantarum*, 54: 237-244, 2010.

- Arigita, L.; Cañal, M. J.; Tamés, R. S.; González, A. CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and micronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 46: 312-322, 2010.

- Arrabal, R.; Amancio, F.; Carneiro, L. A.; Neves, L. J.; Mansur, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation*, 11: 1081-1089, 2002.

- Ashraf, M. & Iram, A. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora*, 200: 535-546, 2005

- Atkinson, D. E. Cellular energy metabolism and its regulation. New York, Academic Press. 293 p., 1977.

- Badr, A.; Angers, P.; Desjardins, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 13-24, 2011.

- Barboza, S. B. S. C.; Caldas, L. S.; Souza, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth-Cayenne de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 725-733, 2004.

- Basu, S.; Gangopadhyay, G.; Mukherjee, B. B. Salt tolerance in rice *in vitro*: implication of accumulation of Na⁺, K⁺ and proline. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 55-64, 2002.

- Bates, L. S.; Waldren, R.P.; Teare, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207, 1973.

- Bařková, P.; Pospíšilová, J.; Synková, H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. *Biologia Plantarum*, 52: 413-422, 2008.

- Bellintani, M. C.; Lima, C. C.; Brito, A. L.; Santana, J. R. F.; Dornelles, A. L. C. Efeito da ventilação *in vitro* na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 1098-1100, 2007.

- Benzing, D. H.; Henderson, K.; Kessel, B.; Sulak, J. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *American Journal of Botany*, 63: 1009-1014, 1976.

- Benzing, D. H. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press. 690 p., 2000.

- Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 20313-20316, 1997.

- Beauchamp, C. & Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44: 276-287, 1971.

- Bienert, G. P.; Schjoerring, J. K.; Jahn, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 994-1003, 2006.

- Blokina, O. & Fagerstedt, K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, 138: 447-462, 2010.

- Borghezan, M.; Moraes, L. K. A.; Moreira, F. M.; Silva, A. L. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 783-789, 2003.

- Bowler, C.; Montagu, M. V.; Inzé, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 83-116, 1992.

- Braga, V. F. Estresse oxidativo em plantas micropropagadas de *Pitcairnia albiflos* Herb. (Bromeliaceae) durante a aclimatização e sob estresse hídrico. Dissertação de Mestrado, Juiz de Fora, 61 p., 2011.

- Brained, K. E. & Fuchigami, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106: 515-518, 1981.

- Bray, E. A. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103: 1035-1040, 1993.

- Bray, E. A. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2: 48-54, 1997.

- Carneiro, L. A.; Araújo, R. F. G.; Brito, G. J. M.; Fonseca, M. H. P. B.; Costa, A.; Crocomo, O. J.; Mansur, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith., an endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 79-83, 1999.

- Carneiro, L. A.; Cândido, M. S. D.; Araújo, R. F. G.; Fonseca, M. H. P. B.; Crocomo, O. J.; Mansur, E. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L. B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4: 153-158, 1998.

- Carneiro, L. A. & Mansur, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidalia*, 2: 12-20, 2004.

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

- Carvalho, L. C.; Osório, M. L.; Chaves, M. M.; Amâncio, S. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 271-280, 2001.

- Carvalho, M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3: 156-165, 2008.

- Casanova, E.; Moysset, L.; Trillas, M. I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biologia Plantarum*, 52: 1-8, 2008.

- Cassells, A. C. & Curry, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 145-157, 2001.

- Chance, B. & Maehley, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2: 764-775, 1955.

- Chanemougasoundharam, A.; Sarkar, D.; Pandey, S. K.; Al-Biski, F.; Helali, O.; Minhas, J. S. Culture tube closure-type affects potato plantlets growth and chlorophyll contents. *Biologia Plantarum*, 48: 7-11, 2004.

- Chaves, M. M.; Maroco, J. P.; Pereira, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30: 239-264, 2003.

- Chaves, M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551-560, 2009.

- Chen, U.-C.; Hsia, C.-N.; Agrawal, D. C.; Tsay, H.-S. Influence of ventilation closures on plant growth parameters, acclimation and anatomy of leaf surface in *Scrophularia yoshimurae* Yamazaki – a medicinal plant native to Taiwan. *Botanical Studies*, 47: 259-266, 2006a.

- Chen, U.-C.; Hsia, C.-N.; Yeh, M.-S.; Agrawal D. C.; Tsay, H.-S. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi* – an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 42: 128-133, 2006b.

- Chaves Filho, J. T. & Stacciarini-Seraphin, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hill) em resposta ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Botânica*, 24: 199-204, 2001.

- Chaves, M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought 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.

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

- Cogliatti-Carvalho, L.; Rocha-Pessôa, T. C.; Nunes-Freitas, A. F.; Rocha, C. F. D. Volume de água armazenado no tanque de bromélias, em restingas da costa brasileira. *Acta Botanica Brasilica*, 24: 84-95, 2010.

- Crayn, D. M.; Winter, K.; Smith, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101: 3703-3708, 2004.

- Cronquist, A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York. 1262 p., 1981.

- Cronquist, A. The evolution and classification of flowering plants. 2ed. The New York Botanical Garden, New York. 555 p., 1988.

- Dal Vesco, L. L. & Guerra, M. P. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular 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 zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. *Scientia Horticulturae*, 128: 515-522, 2011.

- Delauney, A. J. & Verma, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4: 215-223, 1993.

- Del Longo, O. T.; González, C. A.; Pastori, G. M.; Trippi, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant & Cell Physiology*, 34: 1023-1028, 1993.

- Dinakar, C.; Djilianov, D.; Bartels, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science*, 182: 29-41, 2012.

- Droste, A.; Silva, A. M.; Matos, A. V.; Almeida, J. W. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48: 717-722, 2005.

- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356, 1956.

- Endres, L. & Mercier, H. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivate *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemical*, 41: 181-187, 2003.

- Ennajeh, M.; Vadel, A. M.; Khemira, H. Osmoregulation and osmoprotection in the leaf cells of two olive cultivars subjected to severe water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 711-721, 2009.

- Evers, D.; Lefèvre, I.; Legay, S.; Lamoureux, D.; Hausman, J.-F.; Rosales, R. O. G.; Marca, L. R. T.; Hoffmann, L.; Bonierbale, M.; Schafleitner, R. Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2327-2343, 2010.

- Faisal, M. & Anis, M. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 125-132, 2009.

- Favretto, M. A.; Hoeltgebaum, M. P.; Lingnau, R.; D'Agostini, F. M. Entomofauna em duas espécies de bromélias no oeste de Santa Catarina, Brasil. *EntomoBrasilis*, 4: 10-12, 2011.

- Fay, M. F. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? *Biodiversity and Conservation*, 3: 176-183, 1994.

- Forzza, R. C. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. Ex Schult. & Schult. F. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 23: 1-49, 2005.

- Foyer, C. H.; Descourvières, P.; Kunert, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanisms studied in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment*, 15: 507-523, 1994.

- Freschi, L.; Azevedo, L. V. G.; Purgatto, E.; Mercier, H. Sinalização hormonal da indução da fotossíntese CAM em bromélia epífita C₃-CAM facultativa submetida ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 468-470, 2007.

- Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97-112, 1995.

- Fuentes, G.; Talavera, C.; Desjardins, Y.; Santamaria, J. M. High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. *Biologia Plantarum*, 49: 7-15, 2005.
- Fundação Biodiversitas. Revisão da Lista da Flora Brasileira ameaçada de extinção, 2005 (disponível em http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/destaque_flora.asp).
- 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.
- Gao, J.; Xiao, Q.; Ding, L.; Chen, M.; Yin, L.; Li, J.; Zhou, S.; He, G. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in *Alternanthera philoxeroides* and *Oryza sativa* subjected to drought stress. *Plant Growth Regulation*, 56: 89-95, 2008.
- Garg, B. K.; Kathju, S.; Burman, U. Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes. *Biologia Plantarum*, 44: 289-292, 2001.
- George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G.-J. Plant propagation by tissue culture – Volume 1: The background. 3rd Ed., Springer, Dordrecht. 501 p., 2008.
- Giannopolitis, C. N. & Ries, C. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314, 1977.
- Girardi, C. G. & Pescador, R. Aclimação de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12: 62-72, 2010.
- Givnish, T. J. Hallmarks of the New World. *Systematic Biology*, 54: 340-344, 2005.
- Gomes, F. P. Curso de Estatística Experimental. 10^a edição. São Paulo: Nobel. 430 p., 1982.

- González-Salvatierra, C.; Andrade, J. L.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Peña-Rodríguez, L. M. Antioxidant content in two CAM bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest. *Journal of Plant Physiology*, 167: 792-799, 2010.

- Gour, V. S.; Sharma, S. K.; Emmanuel, C. J. S. K.; Kant, T. Stomata and chlorophyll content as marker traits for hardening of in vitro raised *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. Plantlets. *National Academy Science Letters-India*, 30: 45-47, 2007.

- 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.

- Grene, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. 20 p., 2002.

- 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, 2003/4.

- Guy, C.; Kaplan, F.; Kopka, J.; Selbig, J.; Hinch, D. K. Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 132: 220-235, 2008.

- Hameed, A.; Bibi, N.; Akhter, J.; Iqbal, N. Differential changes in antioxidant, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 178-185, 2011.

- Handa, S.; Handa, A. K.; Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiology*, 80: 938-945, 1986.

- Hare, P. D. & Cress, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21: 79-102, 1997.

- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies Jr., F. T.; Geneve, R. L. *Plant propagation: principles and practices*. 7th Ed. 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.

- Havir, E. A. & McHale, N. A. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO₂. *Plant Physiology*, 89: 952-957, 1989.

- Hazarika, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85: 1704-1712, 2003.

- Hazarika, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105-120, 2006.

- Hoekstra, F. A.; Golovina, E. A.; Buitink, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 431-438, 2001.

- Hong, Z.; Lakkineni, K.; Zhang, Z.; Verma, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*, 122: 1129-1136, 2000.

- Hu, W. H.; Xiao, Y. A.; Zeng, J. J.; Hu, X. H. Photosynthesis, respiration and antioxidant enzymes in pepper leaves under drought and heat stresses. *Biologia Plantarum*, 54: 761-765, 2010.

- 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.

- Ingram, J. & Bartels, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 377-403, 1996.
- Ishibashi, Y.; Yamaguchi, H.; Yuasa, T.; Iwaya-Inoue, M.; Arima, S.; Zheng, S. H. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1562-1567, 2011.
- Ivanova, M. & Staden, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. *Plant Growth Regulation*, 60: 143-150, 2010.
- Jacques-Felix, H. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. *Selbyana*, 21: 118-124, 2000.
- Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Wahid, A.; Farooq, M.; Al-Juburi, H. J.; Somasundaram, R.; Panneerselvan, R. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11: 100-105, 2009.
- Jeon, M.-W.; Ali, M. B.; Hahn, E.-J.; Paek, K.-Y. Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during *ex vitro* acclimatization of micropropagated CAM *Doritaenopsis* plantlets under relative humidity and air temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 55: 183-194, 2006.
- Joyce, S. M.; Cassells, A. C.; Jain, S. M. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 103-121, 2003.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. *Sistemática Vegetal. Um enfoque filogenético*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed. 632 p., 2009.
- Kar, M. & Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57: 315-319, 1976.

- Kavi Kishor, P. B.; Hong, Z.; Miao, G.-H.; Hu, C.-A. A.; Verma, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108: 1387-1394, 1995.

- Kevers, C.; Franck, T.; Strasser, R. J.; Dommès, J.; Gaspar, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 181-191, 2004.

- Kibinza, S.; Bazin, J.; Bailly, C.; Farrant, J. M.; Corbineau, F.; El-Maarouf-Bouteau, H. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science*, 181: 309-315, 2011.

- Knudson, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-217, 1946.

- Kozai, T. Photoautotrophic micropropagation – environmental control for promoting photosynthesis. *Propagation of Ornamental Plants*, 10: 188-204, 2010.

- Krishna, H.; Sairam, R. K.; Singh, S. K.; Patel, V. B.; Sharma, R. R.; Grover, M.; Nain, L.; Sachdev, A. Mango explant browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia Horticulturae*, 118: 132-138, 2008.

- Leme, E. M. C. *Canistrum: Bromélias da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro, Salamandra, 107 p., 1997.

- Leme, E. M. C.; Fontana, A. P.; Halbritter, H. Three new *Pitcairnia* species (Bromeliaceae) from the inselbergs of the Espírito Santo, Brazil. *Systematic Botany*, 35: 487-496, 2010.

- Li, F.-L.; Bao, W. K.; Wu, N. Morphological, anatomical and physiological responses of *Campylotropis polyantha* (Franch.) Schindl. Seedlings to progressive water stress. *Scientia Horticulturae*, 127: 436-443, 2011.

- Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382, 1987.

- Liu, C.; Liu, Y.; Guo, K.; Fan, D.; Li, G.; Zheng, Y.; Yu, L.; Yang, R. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 174-183, 2011.

- Lokhande, V. H.; Nikam, T. D.; Patade, V. Y.; Ahire, M. L.; Suprasanna, P. Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and *in vitro* growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 41-49, 2011.

- Lokhande, V. H.; Nikam, T. D.; Penna, S. Biochemical, physiological and growth changes in responses to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102: 17-25, 2010.

- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275, 1951.

- Lucchesini, M. & Mensuali-Sodi, A. Influence of medium composition and vessel ventilation on *in vitro* propagation of *Philly latifolia* L. *Scientia Horticulturae*, 100: 117-125, 2004

- Luther, H. E. An alphabetical list of bromeliad binomials. Bromeliad Society International, 11th ed. The Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota, 2008.

- Mahajan, S. & Tuteja, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158, 2005.

- Maia, P. S. P.; Neto, C. F. O.; Castro, D. S.; Freitas, J. M. N.; Lobato, A. K. S.; Costa, R. C. L. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 918-920, 2007.

- Malda, G.; Suzán, H.; Backhaus, R. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*, 81: 71-87, 1999.
- Mapes, O. M. Tissue culture of bromeliads. *International Plant Propagators Society Combined Proceedings*, 23: 47-55, 1973.
- Martinelli, G. & Forzza, R. C. *Pitcairnia* L'Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L. B. Sm. *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 603-607, 2006.
- Martinelli, G. The bromeliads of the Atlantic Forest. *Scientific American*, 282: 86-93, 2000.
- 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.
- Marur, C. J. Fotossíntese e translocação de carboidratos em algodoeiros submetidos à déficit hídrico após a aplicação de cloreto de mepiquat. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10: 59-64, 1998.
- Mattioli, R.; Costantino, P.; Trovato, M. Proline accumulation in plants. Not only stress. *Plant Signalling & Behavior*, 4: 1016-1018, 2009.
- Medina, E. Eco-fisiología y evolución de las Bromeliaceae. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias*, 59: 71-100, 1990.
- 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 *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 972-974, 2007.

- Mercier, H. & Kerbauy, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30: 247-249, 1992.

- Mercier, H. & Kerbauy, G. B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic brazilian bromeliad. Botanic Gardens Micropropagation News, 1: 70-72, 1993.

- Mercier, H. & Kerbauy, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. Journal of the Bromeliad Society, 44: 120-124, 1994.

- Mercier, H. & Kerbauy, G. B. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. Selbyana, 16: 147-149, 1995.

- Mercier, H. & Kerbauy, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 40, High-Tech and Micropropagation VI. Springer-Verlag, Berlin, pp. 43-57, 1997.

- Mestre, L. A. M.; Aranha, J. M. R.; Esper, M. L. P. Macroinvertebrate fauna associated to the bromeliad *Vriesea inflata* of the Atlantic Forest (Paraná State, Southern Brazil). Brazilian Archives of Biology and Technology, 44: 89-94, 2001.

- 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.

- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7: 405-410, 2002.

- Mohamed, M. A.-H. & Alsdon, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. Scientia Horticulturae, 123: 295-300, 2010.

- Mohammadkhani, N. & Heidari, R. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal*, 3: 448-453, 2008.

- Molinari, H. B. C.; Marur, C. J.; Filho, J. C. B.; Kobayashi, A. K.; Pileggi, M.; Júnior, R. P. L.; Pereira, L. F. P.; Vieira, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science*, 167: 1375-1381, 2004.

- Molinari, H. B. C.; Marur, C. J.; Daros, E.; Campos, M. K. F.; Carvalho, J. F. R. P.; Filho, J. C. B.; Pereira, L. F. P.; Vieira, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 130: 218-229, 2007.

- 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. 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.

- 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.

- Morellato, L. P. C. & Haddad, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*, 32: 786-792, 2000.

- 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.

- Nanjo, T.; Kobayashi, M.; Yoshiba, Y.; Sanada, Y.; Wada, K.; Tsukaya, H.; Kakubari, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 18: 185-193, 1999.

- Nguyen, Q. T. & Kozai, T. Growth of *in vitro* banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37: 824-829, 2001.

- Nievola, C. C.; Kraus, J. E.; Freschi, L.; Souza, B. M.; Mercier, H. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 41: 832-837, 2005.

- Ozden, M.; Demirel, U.; Kahraman, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae*, 119: 163-168, 2009.

- Paiva, P. D. O.; Naves, V. C.; Paiva, R.; Pasqual, M. Avaliação de diferentes formulações de sais minerais para a micropropagação de *Nidularium fulgens* Lam. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 2: 9-14, 2006.

- Parida, A. K.; Dagaonkar, V. S.; Phalak, M. S.; Aurangabadkar, L. P. Differential responses of enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 619-627, 2008.

- Parida, A. K.; Dagaonkar, V. S.; Phalak, M. S.; Umalkar, G. V.; Aurangabadkar, L. P. Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnology Report*, 1: 37-48, 2007.

- Peixoto, P. H. P.; Cambraia, J.; Sant'Anna, R.; Mosquim, P. R.; Moreira, M. A. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzyme of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11: 137-143, 1999.
- Pereira, A. R.; Pereira, T. S.; Rodrigues, A. S.; Andrade, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Botanica Brasilica*, 22: 1150-1162, 2008.
- Perl-Treves, R. & Perl, A. Oxidative stress: an introduction. In: *Oxidative Stress in Plants*, 2002. Disponível em http://www.biu.ac.il/LS/People/staff/Perl_Articles_new_v1/Oxidativechapter.pdf
- Peterbauer, T. & Richter, A. *Biochemistry and Physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. Seed Science Research*, 11: 185-197, 2001.
- Pickens, K. A.; Wolf, J.; Affolter, J. M.; Wetzstein, H. I. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 42: 348-353, 2006.
- 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.
- Pompelli, M. F.; Fernandes, D.; Guerra, M. P. Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae) – an endangered bromeliad form South Brazil. *Propagation of Ornamental Plants*, 5: 192-198, 2005.
- Porembski, S. & Barthlott, W. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. *Harvard Papers in Botany*, 4: 175-184, 1999.
- Pospíšilová, J.; Haisel, D.; Synková, H.; Bařková-Spoustová, P. Improvement of *ex vitro* transfer of tobacco plantlets by addition of abscisic acid to the last subculture. *Biologia Plantarum*, 53: 617-624, 2009.

- Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadleček, P.; Haisel, D.; Plzánková, Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42: 481-497, 1999.

- Pospíšilová, J.; Synková, H.; Haisel, D.; Semoradová, Š. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a review). *Acta Horticulturae*, 748: 29-38, 2007.

- Rech Filho, A.; Dal Vesco, L. L.; Guerra, M. P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from Atlantic Forest. *Ciência Rural*, 39: 909-912, 2009.

- Rech Filho, A.; Dal Vesco, L. L.; Nodari, R. O.; Lischka, R. W.; Müller, 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.

- Rosumek, F. B.; Ulysséa, M. A.; Lopes, B. C.; Steiner, J.; Zillikens, A. Formigas de solo e de bromélias em uma área de Mata Atlântica, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil: Levantamento de espécies e novos registros. *Biotemas*, 21: 81-89, 2008.

- Rybczyński, J. J.; Borkowska, B.; Fiuk, A.; Gawrońska, H.; Śliwińska, E.; Mikula, A. Effect of sucrose concentration of photosynthetic activity of *in vitro* cultures *Gentiana kurroo* (Royle) germlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 445-453, 2007.

- Saher, S.; Piqueras, A.; Hellin, E.; Olmos, E. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 149-158, 2005.

- Sajedi, N. A.; Ardakani, M. R.; Madani, H.; Naderi, A.; Miransari, M. The effects of selenium and other micronutrients on the antioxidant activities and yield of corn (*Zea*

- mays* L.) under drought stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17: 215-222, 2011.
- 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.
 - Seelye, J. S.; Burge, G. K.; Morgan, E. R. Acclimatizing tissue culture plants: reducing the shock. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*, 53: 85-90, 2003.
 - Seki, M.; Umezawa, T.; Urano, K.; Shinozaki, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 296-302, 2007.
 - Scandalios, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101: 7-12, 1993.
 - Shah, A. R.; Khan, T. M.; Sadaqat, H. A.; Chatha, A. A. Alterations in leaf pigments in cotton (*Gossypum hirsutum*) genotypes subjected to drought stress conditions. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13: 902-908, 2011.
 - Shao, H.-B.; Chu, L.-Y.; Lu, Z.-H.; Kang, C.-M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4: 8-14, 2008.
 - Sharma, S.; Villamor, J. G.; Verslues, P. E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology*, 157: 292-304, 2011.
 - Silva, E. C.; Nogueira, R. J. M. C.; Vale, F. H. A.; Melo, M. F.; Araújo, F. P. Water relations and organic solutes in four umbu tree (*Spondias tuberosa*) genotypes under intermittent drought. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 21: 43-53, 2009.

- Silva, J. R. R. Comportamento ecofisiológico de plantas jovens de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). Dissertação de mestrado, Belém, 40 p., 2009.

- Silveira, D. G.; Souza, F. V. D.; Pelacani, C. R.; Souza, A. S.; Ledo, C. A. S.; Santana, J. R. F. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez., a fiber producing bromeliad from Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 923-932, 2009.

- 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.

- Smirnoff, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125: 27-58, 1993.

- Smith, L. B. & Downs, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, Hafner Press, 14: 1-658, 1974.

- Soneji, J. R.; Rao, P. S.; Mhatre, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Cell Reports*, 20: 891-894, 2002.

- 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.

- Souza, V. C. & Lorenzi, H. *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. p. 162-166, 2005.

- Sreedhar, R. V.; Venkatachalam, L.; Neelwarne, B. Hyperhydricity-related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 46-57, 2009.

- Szabados, L. & Savouré, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15: 89-97, 2009.

- Teng, W. L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. *Plant Cell Reports*, 16: 454-457, 1997.

- Trovato, M; Mattioli, R; Costantino, P. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei*, 19: 325-346, 2008.

- Valliyodan, B. & Nguyen, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 189-195, 2006.

- Van Handel, E. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*, 22: 280-283, 1968.

- Van Huylbroeck, J. M.; Piqueras, A.; Debergh, P. C. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science*, 155: 59-66, 2000.

- Vendruscolo, E. C. G.; Schuster, I.; Pileggi, M.; Scapim, C. A.; Molinari, H. B. C.; Marur, C. J.; Vieira, L. G. E. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1367-1376, 2007.

- Verbruggen, N. & Hermans, C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753-759, 2008.

- 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.

- Verslues, P. E. & Sharma, S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book*, 8, 2010.

- Vieira, C. M. *Quesnelia* Gaudich. (Bromelioideae: Bromeliaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Pesquisas, Botânica*, 57: 7-102, 2006.

- Vieira, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. Tecnologias *in vitro* aplicadas à conservação de recursos genéticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 14: 15-21, 2000.

- Wang, W.-B.; Kim, Y.-H.; Lee, H.-S.; Kim, K.-Y.; Deng, X.-P.; Kwak, S. S. Analyses of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 570-577, 2009.

- Watanabe, S.; Kojima, K.; Ide, Y.; Sasaki, S. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 199-106, 2000.

- Wilkinson, S. & Davies, W. J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment*, 33: 510-525, 2010.

- Xiao, Y.; Lok, Y. H.; Kozai, T. Photoautotrophic growth of sugarcane plantlets *in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 39: 186-192, 2003.

- Xiao, Y.; Niu, G.; Kozai, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105: 149-158, 2011.

- Xiong, L. & Zhu, J.-K. Salt tolerance. In: Somerville, C. R. & Meyerowitz, E. M. (Eds). *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, 2002.

- Xu, J.; Yin, H.; Li, X. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Reports*, 28: 325-333, 2009.

- Yang, Y.; Shi, R.; Wei, X.; Fan, Q.; An, L. Effect of salinity on antioxidant enzymes in calli of the halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102: 387-395, 2010.

- Yoshida, Y.; Kiyosue, T.; Nakashima, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant & Cell Physiology*, 38: 1095-1102, 1997.

- Zhang, S.; Han, S.; Yang, W.; Wei, H.; Zhang, M.; Qi, L. Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100: 21-29, 2010.

- Zheng, Y. X.; Wu, J. C.; Cao, F. L.; Zhang, Y. P. 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, 2010.

- Zobayed, S. M. A.; Afreen, F.; Xiao, Y.; Kozai, T. Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40: 450-458, 2004.

- Zornig, R. K. Micropropagação de bromélias. *Bromélia*, 3: 3-8, 1996.