

MARIA GESSI TEIXEIRA

Micropropagação de *Nidularium minutum* Mez  
(Bromeliaceae): influência de reguladores de  
crescimento e atividades do sistema antioxidante na  
brotação

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais, da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTORA em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

São Paulo

2023

MARIA GESSI TEIXEIRA

Micropropagação de *Nidularium minutum* Mez  
(Bromeliaceae): influência de reguladores de  
crescimento e atividades do sistema antioxidante na  
brotação

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais, da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTORA em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

Orientadora: Dra. Catarina Carvalho Nievola

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECAS E MAPOTECAS**

Teixeira, Maria Gessi

T267m Micropropagação de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae): influência de reguladores de crescimento e atividades do sistema antioxidante na brotação / Maria Gessi Teixeira - - São Paulo, 2023.  
106p.; il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 2023.  
Bibliografia.

1. Anatomia. 2. Espécies ameaçadas. 3. ROS. I. Título.

CDU: 582.26

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Catarina Carvalho Nievola (orientadora)

Dra. Marília Gaspar

Dra. Juliana Aparecida Fernando

Dr. Breno Régis Santos

Dr. Evandro Alves Vieira

*“Nós amamos, nas Bromeliaceae, o character, por assim dizer clássico, dos seus contornos: sua forma é a de uma amphora, de um vaso grego ou de uma roseta; suas folhas descrevem curvas correctas, seus tecidos são firmes e sua superfície é frequentemente ornamentada com zebruras ou coloridos diversos; algumas defendem seus fructos com armas cerradas. As suas folhas são quasi sempre attrahentes e sempre de longa duração, tem bellos enfeites e nada pediram à perfumaria.”*

Pio Corrêa, M.; Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas (1926)

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA) e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente por proporcionar suporte e infraestrutura para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) e todos meus colegas de trabalho por motivar e possibilitar a concretização deste doutorado, proporcionando um melhoramento em minha carreira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela contribuição financeira fornecido ao IPA através do Plano de Desenvolvimento Institucional de Pesquisa dos Institutos Estaduais de Pesquisa no Estado de São Paulo (PDIP) (processo 17/50341-0), que possibilitou a realização deste estudo.

À minha orientadora, Dra. Catarina Carvalho Nievola, pela confiança em me aceitar como aluna e pelos ensinamentos que me acrescentaram tanto.

À Dra. Adriana Hissae Hayashi, por ter me instruído nas técnicas de Anatomia Vegetal e pela grande colaboração com o presente estudo, além de proporcionar momentos descontraídos com muita conversa boa.

Ao Dr. Shoey Kanashiro pela sabedoria que pude desfrutar em bons momentos durante meu doutoramento.

Ao Dr. Wellington Marota Barbosa por ter me mostrado, pela primeira vez, e me ensinado as maravilhas da cultura de tecido de plantas.

À Fernanda Satori Petrongaripor por gentilmente ter colaborado com as capturas de imagens do material observado em estereoscópio.

Também agradeço ao Jorge Luiz Marx Young e Ivomar Medina pela amizade e pelo apoio técnico que me auxiliou bastante durante o período de doutorado.

Às minhas colegas Victória de Carvalho, Gabriela Maria Cabral, Maria Solange Francos, Natalia Sêneda Martarello, pelo apoio e amizade.

À minha filha amada Dora e minha mãe Maria Alice, que sempre apoiaram minhas escolhas e sempre me incentivaram.

Aos meus queridos irmãos, cunhados e sobrinhos, que sempre tiveram interesse nos meus trabalhos de pesquisas.

Ao meu querido companheiro João Paulo Ferreira Rodrigues.

## RESUMO

A micropropagação é uma técnica que tem sido utilizada para a conservação de espécies de bromélias, pois possibilita a produção de grande quantidade de plantas em curto espaço de tempo, destinadas ao abastecimento do mercado de ornamentais ou para uso em programas de reflorestamento. *Nidularium minutum* é uma bromélia endêmica e vulnerável que possui potencial ornamental, o que torna importante o desenvolvimento de protocolos de micropropagação visando sua conservação. Reguladores de crescimento de plantas (PGR) e fontes nitrogenadas, bem como variações na temperatura e luz, têm sido associados à indução da multiplicação *in vitro*. Entretanto, não foi estabelecida relação entre ativação do sistema antioxidante e os fatores indutores da brotação de bromélias, o que poderia indicar que o processo de diferenciação celular das plantas submetidas à multiplicação *in vitro* ativaría respostas de estresse. Os objetivos deste estudo foram investigar a possível influência dos reguladores de crescimento da multiplicação *in vitro* sobre as atividades enzimáticas do sistema antioxidante durante o processo de obtenção de clones de *N. minutum*, bem como a anatomia desta bromélia durante a brotação. Foram testados meios indutores de multiplicação que continham diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Números de brotos, parâmetros biométricos, pigmentos fotossintéticos e sobrevivência após aclimatização foram avaliados. Análises anatômicas foram realizadas durante as fases da brotação. As atividades de enzimas do sistema antioxidante foram analisadas nas plantas dos tratamentos nos quais a brotação foi induzida e comparadas com as plantas que não brotaram. Os resultados mostraram que a brotação *in vitro* de *N. minutum* é assíncrona e intensificada pelo BAP. A formação de brotos em 100% das plantas ocorreu somente após 240 dias de cultivo em meio com a citocinina. Uma pequena parcela das plantas tem tendência a brotar mesmo em meio livre de PGR e há diferença na capacidade de brotação entre os diferentes indivíduos. As plantas originárias dos brotos foram aclimatizadas com sucesso para todos os tratamentos. A formação de brotos é acompanhada de ajustes na atividade das enzimas do sistema antioxidante que variam durante a diferenciação dos tecidos de gemas para brotos, evidenciados pelas análises anatômicas. Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) variam dependendo da quantidade de gemas ou tecido já diferenciado, sendo que nas plantas que brotaram estes foram menores em relação às plantas que não apresentavam brotos. As análises anatômicas revelaram a presença de tricomas (coléteres) na região apical do caule não descritos para a espécie. Este trabalho contribuiu para aprofundar o conhecimento sobre dos fatores endógenos que controlam o processo de organogênese de *N. minutum*, criando subsídios para estudos da indução da produção de mudas via brotações *in vitro*.

**Palavras-chave:** Anatomia; Bromélia; Cultivo *in vitro*; Enzimas antioxidantes; Espécies ameaçadas; Espécies reativas de oxigênio; Planta ornamental; Peroxidação lipídica.



## ABSTRACT

Micropropagation is a technique that has been used for the conservation of bromeliad species, as it allows the production of a large quantity of plants in a short space of time, destined to supply the ornamental market or for use in reforestation programs. *Nidularium minutum* is an endemic and vulnerable bromeliad that has ornamental potential, which makes the development of micropropagation protocols aimed at its conservation important. Plant growth regulators (PGR) and nitrogen sources, as well as variations in temperature and light, have been associated with the induction of in vitro multiplication. However, no relationship has been established between activation of the antioxidant system and the factors that induce bromeliad sprouting, which could indicate that the process of cellular differentiation of plants subjected to in vitro multiplication would activate stress responses. The objectives of this study were to investigate the possible influence of in vitro multiplication growth regulators on the enzymatic activities of the antioxidant system during the process of obtaining clones of *N. minutum*, as well as the anatomy of this bromeliad during shooting. Multiplication-inducing media containing different concentrations of PGR were tested. Shoot numbers, biometric parameters, photosynthetic pigments and survival after acclimatization were evaluated. Anatomical analyzes were carried out during the budding phases. The activities of antioxidant system enzymes were analyzed in plants from treatments in which sprouting was induced and compared with plants that did not sprout. The results showed that in vitro shooting of *N. minutum* is asynchronous and enhanced by BAP. The formation of shoots in 100% of the plants occurred only after 240 days of cultivation in medium with cytokinin. A small portion of plants tend to sprout even in a medium free of PGR and there is a difference in sprouting capacity between different individuals. The plants originating from the shoots were successfully acclimatized to all treatments. The formation of sprouts is accompanied by adjustments in the activity of enzymes of the antioxidant system that vary during the differentiation of tissues from buds to sprouts, evidenced by anatomical analyses. Lipid peroxidation (LPO) levels vary depending on the amount of buds or tissue already differentiated, and in plants that sprouted these were lower compared to plants that did not have sprouts. Anatomical analyzes revealed the presence of trichomes (colleters) in the apical region of the stem, undescribed for the species. This work contributed to deepening knowledge about the endogenous factors that control the organogenesis process of *N. minutum*, creating support for studies on the induction of plant production via in vitro sprouting.

**Keywords:** Anatomy; Antioxidant enzymes; bromeliad; Endangered species; In vitro plant culture; Lipid peroxidation; Ornamental plant, Reactive oxygen species.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** *Nidularium minutum*. A: touceira na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba; B: planta em floração; C: flor; D: planta em ambiente natural brotando após predação do ápice por animais silvestres; E: planta em vaso brotando após floração. Setas indicam brotação.....21

**Figura 2:** Etapas do experimental do trabalho com *Nidularium minutum* que foi dividido em duas partes. A-C: primeira parte; D-F: segunda parte; G-I: terceira parte. A – Visão geral da planta *Nidularium minutum in vitro*; B – Plantas de *N. minutum* com brotos após 240 dias de cultivo em meio MS com BAP; C – Plantas de *N. minutum* aclimatizadas; D – Planta de *N. minutum* cultivada por 90 dias em meio MS sem PGR; E – *N. minutum* cultivada em meio para brotação; F – Corte longitudinal de *N. minutum* com brotos aos 90 dias de cultivo; G – Planra de *N. minutum* cultivada em MS sem reguladores de crescimento aos 90 dias ; H – Processo de preparação de lâminas histológicas; I – Cortes anatômicos da planta de *N. minutum* cultivada em meio MS por 90 dias.....27

### **Capítulo I: Differential sprouting ability during micropropagation of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)**

**Figura 1:** Variation of sprouting capacity in *Nidularium minutum* seedlings during the first 240 days of culture and sprouted clones after subculturing them for 45 days in a PGR-free medium).....50

**Figura 2:** Differential multiplication capacity of *Nidularium minutum* individuals grown in a PGR-free medium.....50

**Figura 3:** Shooting in *Nidularium minutum* grown in a culture medium with the addition of 6-benzylaminopurine (BAP) and/or 1-naphthylacetic acid (NAA). Control medium = PGR-free. (A) Percentage of *Nidularium minutum* plants with shoots grown for 240 days; (B) Number of shoots per *N. minutum* plant after 240 days of cultivation.....51

**Figura 4:** Steps in *Nidularium minutum* propagation. (A) Seedlings approximately 30 days after germination. (B) Plants obtained from the PGR-free medium after 240 days. (C) Treatment plants with 1.0 mgL<sup>-1</sup> BAP after 240 days. (D) Detail of the shoot proliferation from one seedling. (E) Shoots separated from the mother plant (the mother plant is no longer recognized). (F) Detail of the individualized shoot with roots. (G) Plants with 60 days of acclimatization. (Bars = 2 cm).....52

### **Capítulo II: Dinâmica da atividade de enzimas antioxidantes e alterações anatômicas durante a brotação *in vitro* de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)**

**Figura 1:** Caracterização da brotação e biometria de *Nidularium minutum* cultivadas em meio MS com adição de 6-benzilaminopurina (BAP); Meio de controle não possui BAP. A - Porcentagem de plantas com brotos durante 240 dias de cultivo. B – Número de brotos por planta aos 240 dias. C – Comprimento da parte aérea aos 240 dias. D - Biomassas aos 240 dias.....64

**Figura 2:** Nível de peroxidação lipídica (LPO) em termos de conteúdo de hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas (HPDC) no período inicial (IT), aos 90 dias e 240 dias de *Nidularium minutum* cultivadas em meio MS com e sem BAP. Aos 90 dias, as plantas cultivadas em meio com BAP foram divididas em plantas com brotos (PS) e plantas com nenhum broto (PNS). Os dados indicados com letras iguais não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM.....65

**Figura 3:** Atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e GR) de *Nidularium minutum* no período inicial (IT), aos 90 dias e aos 240 dias de plantas cultivadas em meio MS com ou sem BAP. Aos 90 dias, as plantas cultivadas em meio com BAP foram divididas em plantas com brotos (PS) e plantas com nenhum broto (PNS).....66

**Figura 4:** Cortes longitudinais do caule de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* por 90 dias em meio MS sem e com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. A - Controle; inset: planta antes de ser fixada em Karnovsky. B - Planta sem broto cultivada em meio MS com BAP. C - Planta sem broto cultivada em meio MS com BAP, mas com gemas na base intumescida do caule. D e E - Detalhes das gemas na base intumescida do caule de plantas sem brotos cultivadas em meio MS com BAP. F - Distribuição dos grãos de amido de uma planta sem broto cultivada em meio MS com BAP.....68

**Figura 5:** Cortes longitudinais do caule de plantas com brotos de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* em meio MS com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP por 90 dias. A - Planta com dois brotos em desenvolvimento, inset: planta antes de ser fixada em Karnovsky. B-E - Detalhe das gemas e dos brotos formados na região basal do caule da planta. F - Distribuição dos grãos de amido de uma planta com brotos.....70

---

### **Capítulo III: Caracterização anatômica de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae) cultivada *in vitro***

**Figura 1:** Lâmina foliar de *Nidularium minutum* cultivada *in vitro* em meio MS por 90 dias; **a** - Corte longitudinal mostrando as faces adaxial e abaxial da epiderme revestida pela cutícula fina e irregular corada com Sudan IV. **b** - Estômatos da face abaxial em corte paradérmico. **c** - Estômatos e respectivas câmaras subestomáticas na face abaxial da lâmina foliar em corte transversal. **d** - Estômatos da face adaxial do bordo foliar em impressão paradérmica. **e** - Corte longitudinal mostrando escamas nas duas faces foliares. **f** - Detalhe da escama em corte longitudinal. **g** - Impressão paradérmica da escama em vista frontal.....87

**Figura 2:** Cortes transversais (a,b,d) e longitudinal (c) da lâmina foliar de *Nidularium minutum* cultivada *in vitro* em meio de cultura MS por 90 dias. **a** - Detalhe do bordo. **b** - Lâmina foliar. **c** - Detalhe dos idioblastos contendo ráfides e mucilagem; **d** - Feixe vascular.....89

**Figura 3:** Cortes longitudinais (**a, b**) e transversal (**c**) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**d, e**) do ápice caulinar mostrando a localização dos coléteres de *Nidularium minutum* cultivada *in vitro* em meio MS por 90 dias.....91

**Figura 4:** *Nidularium minutum* cultivada *in vitro* por 90 dias em meio MS. **a** - Corte longitudinal mediano do caule da planta fresca. **b** - Corte longitudinal do caule mostrando as folhas e as raízes intracorticais. **c** - Corte transversal do caule mostrando córtex e cilindro vascular, **inset:** idioblasto com ráfides e mucilagem (\*). **d** - Células do córtex caulinar com grãos de amido e idioblasto com ráfides. **e, f** - Cortes longitudinal e transversal da raiz intracortical, respectivamente.....93

## LISTA DE TABELAS

### *Introdução Geral*

**Tabela 1:** Exemplos de estudos com bromélias multiplicadas *in vitro* via brotação.....15

---

### **Capítulo I: Differential sprouting ability during micropropagation of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)**

**Tabela 1:** Biometric parameters of *Nidularium minutum* after 240 days of growth in MS medium with and without the addition of 6-Benzylaminopurine (BAP) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA).....52

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANA: ácido naftaleno acético

ANOVA: análise de variância

APX: ascorbato peroxidase

ATP: adenosina trifosfato

BAP: benzilaminopurina

CAT: catalase

Cepea: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada

DM: massa seca

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FM: massa fresca

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa reduzida

GSSG: dissulfeto de glutationa

HPCD: hidroperóxidos de dienos conjugados

LPO: Peroxidação Lipídica

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MS: meio de cultura Murashige e Skoog

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NBT: azul de nitrotetrazólio

PGR: reguladores de crescimento de plantas

POD: peroxidase

ROS: espécies reativas de oxigênio

SOD: superóxido dismutase

PNS: planta sem broto

PS: planta com broto

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
1.1 Cultura de tecidos vegetais - Micropropagação .....	12
1.1.2 Aclimatização .....	13
1.1.3 Micropropagação de Bromeliaceae .....	14
1.1.4 Anatomia de bromélias cultivadas <i>in vitro</i> .....	18
1.2 Importância ecológica das bromélias .....	19
1.3 Característica que tornam as bromélias de interesse econômico .....	20
1.4 <i>Nidularium minutum</i> : uma bromélia terrícola ameaçada de extinção .....	20
<b>1.5 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Formação de ROS .....	22
1.5.2 ROS e o estresse oxidativo .....	23
1.5.3 Sinalização por Espécies Reativas de Oxigênio .....	24
<b>1.6 Objetivo Geral .....</b>	<b>26</b>
<b>1.7 ATIVIDADES EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>27</b>
<b>1.8. CONTRIBUIÇÃO DO PRESENTE ESTUDO PARA CONSERVAÇÃO DAS BROMÉLIAS.....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>82</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>103</b>

## APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta Tese será apresentada em quatro partes:

A primeira parte apresenta uma introdução geral, os objetivos e uma breve descrição do material e métodos utilizados em todos os trabalhos que deram origem aos artigos apresentados nos capítulos I, II e III.

O Capítulo I traz um artigo que descreve pela primeira vez um protocolo de micropropagação por brotação *in vitro* de *Nidularium minutum* de título “Differential sprouting ability during *in vitro* micropropagation of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)”. Além de caracterizar o assincronismo da brotação desta bromélia, este texto aborda as diferenças da capacidade de brotação entre os diferentes indivíduos desta mesma espécie.

O Capítulo II é composto pelo artigo “Dinâmica da atividade de enzimas antioxidantes e alterações anatômicas durante a brotação *in vitro* de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)”. Este estudo avalia a atividade do sistema antioxidante da brotação, relacionando à anatomia do caule da bromélia durante o desenvolvimento dos brotos em plantas cultivadas *in vitro*.

O Capítulo III consiste no artigo “Caracterização anatômica de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae) cultivada *in vitro*” cujo o objetivo foi analisar a anatomia de *N. minutum* cultivada *in vitro* e identificar quais são as estruturas prováveis que esta planta possui que podem garantir o sucesso da aclimatização.



# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Cultura de tecidos vegetais - Micropropagação

Em 1902, Gottlieb Haberland levantou a hipótese de que as células vegetais são totipotentes, podendo regenerar-se em novas plantas a partir de uma única célula (Haberland, 1902). Esta suposição estimulou pesquisas com cultura de tecido e fisiologia, tendo parte de sua hipótese confirmada por experimentos posteriores. Kotte, em 1922 pela primeira vez cultivou *in vitro* ápices de raízes excisadas de ervilha e milho e Robbin, no mesmo ano, manteve a cultura de ápices de raiz de milho por um período mais longo, chegando a subcultivá-las (Kotte, 1922, citado por Gupta et al., 2020).

Em 1922, Knudson germinou com sucesso sementes de orquídeas *in vitro* (Knudson, 1922). O meio de cultura formulado por Knudson é até hoje usado para o cultivo de orquídeas (Juras et al., 2019; Alexander et al., 2021; Nagananda e Satishchandra, 2023; Šoch et al., 2023). Alguns anos mais tarde, Went descobriu substâncias enraizadoras, o que impulsionou a pesquisa da cultura de tecidos de plantas (Went, 1929, citado por Gupta et al., 2020).

Em 1948 a cinetina foi descoberta como indutora de brotação (Skoog e Tui, 1948) e, em 1957, Skoog e Miller mostraram como o balanço entre auxinas e citocininas é importante para a produção de brotos, raízes e calos (Skoog e Miller, 1957). A micropropagação de plantas e os estágios da micropropagação foram posteriormente descritos por Toshio Murashige (Murashige, 1974). E, desde então, a cultura de tecido de plantas vem sendo estudada e pode ser definida como cultura *in vitro* de tecidos, órgãos, sementes, protoplastos ou embriões em um meio nutritivo sob condições assépticas, onde temperatura, fotoperíodo, umidade, luz e os componentes do meio fornecem ambiente de crescimento ideal e controlado (Torres et al., 2000).

A cultura de tecido é uma ferramenta da biotecnologia vegetal que pode ser aplicada para superar muitos problemas enfrentados pela agricultura e produção hortícola, que podem estar em risco por causa do aquecimento global, mudanças climáticas, desertificação, salinização, crise global da água (Neumann et al., 2020; Viana et al., 2022). Esta técnica pode ser usada para a produção de plantas livres de patógenos (Rani et al., 2019; Pe et al., 2020); hibridização somática (Kumar et al., 2019; Wang et al., 2018); melhorar a genética de plantas comerciais (Naing et al., 2021); obtenção de plantas haplóides para encurtar programas de melhoramento (Sánchez et al., 2020); produção de compostos biologicamente ativos ou metabólitos secundários, especialmente por meio de cultura em suspensão de células vegetais

(Fortini et al., 2021; Kyzioł et al., 2021), produzir diferentes variedades tolerantes a estresses abióticos como seca, salinidade e calor (Karakas et al., 2020; Soleimani et al., 2020) e estudo das ROS e da atividade das enzimas antioxidantes durante a brotação (Rehman et al., 2020; Huang et al., 2021).

Apesar da literatura revelar trabalhos sobre as estratégias de multiplicação *in vitro* para espécies de difícil propagação como os mencionados na revisão de Park (2021), há necessidade de focar também nas espécies raras e ameaçadas de extinção visando a conservação (Dhiman et al., 2020).

### 1.1.2 Aclimatização

Na micropropagação, as plantas passam a fase *in vitro* em um ambiente totalmente controlado. Neste sistema exibem metabolismo heterotrófico ou mixotrófico (Kozai, 2010). Além disso, possuem estômatos pouco funcionais, como também, reduzido espessamento da cutícula e da parede das células epidérmicas, pequeno desenvolvimento do mesofilo foliar, com muitos espaços intercelulares e ausência ou reduzido número de tricomas na epiderme (Hazarika, 2006; Khan et al., 2003). Essas desordens anatômicas podem comprometer as vias metabólicas e acarretar em baixas taxas de sobrevivência durante a fase *ex vitro*, a chamada aclimatização (Hazarika, 2006; Rocha et al., 2008; Silva et al., 2016).

Durante a aclimatização, as plantas passam por modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas necessárias para que possam sobreviver em um novo ambiente (Carvalho et al., 1999). Nesta etapa as plantas geralmente permanecem em casa de vegetação, em ambiente parcialmente controlado. Dessa forma, a passagem de um ambiente totalmente estéril e favorável, que é a fase *in vitro*, para um ambiente parcialmente controlado é considerada um momento crítico da micropropagação (Moraes et al., 2002).

São diversos os trabalhos que abordam a aclimatização de espécies de bromélias cultivadas *in vitro* (Arrigoni-Blank, 2018; Kurita et al., 2014; Martins, et al. 2018;; Pedroso et al., 2010; Resende et al., 2018). Muitos destes estudos utilizam a aclimatização como uma estratégia para devolver plantas a seu habitat natural quando essas correm risco de extinção. Essas pesquisas buscam avaliar quais as influências das condições testadas durante a fase *in vitro* na fase de aclimatização.

### 1.1.3 Micropropagação de Bromeliaceae

Bromeliaceae pertence à ordem das Poales e se distribui pela América Tropical e Subtropical (da Flórida à Argentina). Apenas uma espécie é encontrada na África Tropical (*Pitcairnia feliciana*, não suculenta) (Eggli e Gouda, 2019). Esta extensa família possui 3751 espécies em 82 gêneros. No Brasil encontram-se 1774 (47%) destas espécies (Gouda, Butcher e Gouda, acessado: [03/07/2023]).

Muitas dessas espécies são ornamentais e estão ameaçadas de extinção. O cultivo *in vitro* tem sido considerado uma importante ferramenta para a propagação em massa de bromélias, subsidiando a produção comercial de espécies ornamentais e fornecendo plantas micropropagadas para reintrodução no habitat natural (Huang et al., 2011), tendo assim grande potencial para a conservação de espécies de plantas raras, ameaçadas ou em risco de extinção (Shahzad et al., 2017).

O meio basal mais utilizado no cultivo *in vitro* de espécies de Bromeliaceae é o MS (Murashige e Skoog, 1962) na sua formulação básica ou diluída (Martins et al., 2016; Mercier e Kerbauy, 1997). Várias pesquisas têm desenvolvido ou aprimorado protocolos de micropropagação para espécies de bromélias ameaçadas. Dentre as estratégias que visam o aumento da produção por cultivo *in vitro*, há a indução da brotação lateral e o cultivo de segmentos nodais de plantas estioladas (Barbosa e Caldas, 2001; Kiss et al., 1995; Moreira e Pasqual, 2002; Santos et al., 2010; Tamaki et al., 2007).

Alguns exemplos de espécies micropropagadas pela indução da brotação estão listados na tabela 1. Durante o levantamento bibliográfico não foram encontrados trabalhos que relatassem a brotação *in vitro* de *N. minutum*. Embora nosso grupo de trabalho tenha estabelecido o cultivo *in vitro* a partir de sementes de *N. minutum* (Kurita et al., 2014), foi observado que a indução da brotação poderia tornar mais eficiente a produção de plantas micropropagadas.

Tabela 1: Exemplos de estudos com bromélias multiplicadas *in vitro* via brotação.

Espécie	Objetivo do trabalho	Referência
<i>Guzmania minor</i> ; <i>Guzmania lingulata</i> ; <i>Vriesea splendens</i>	Avaliar a influência do ANA na micropropagação	Pierik et al., 1984
<i>Nidularium fulgens</i>	Determinar protocolo de micropropagação	Pierik e Steegmans, 1984
<i>Tillandsia sp</i> ; <i>Vriesea sp</i> ; <i>Puya mirabilis</i>	Determinar protocolo de micropropagação	Kukulczanka e Czastka, 1988
<i>Ananas comosus</i>	Analisar a influência de diferentes diluições do meio MS na micropropagação	Tamaki et al., 2007
<i>Nidularium procerum</i> ; <i>Nidularium innocentii</i>	Determinar protocolo de micropropagação	Silva et al., 2012
<i>Vriesea incurvata</i>	Avaliar a influência de diferentes concentrações de macronutrientes na micropropagação	Sasamori et al., 2016
<i>Dyckia vicentensis</i>	Determinar protocolo de micropropagação	Flores et al., 2018
<i>Sincoraea mucugensis</i>	Determinar protocolo de micropropagação	Lima et al., 2020
<i>Alcantarea nahoumii</i>	Determinar protocolo de micropropagação	Silva et al., 2020
<i>Dyckia brevifolia</i>	Determinar protocolo de micropropagação	Bertsouklis e Panagaki, 2022
<i>Vriesea splendens</i>	Verificar os efeitos de diferentes citocininas e auxinas na proliferação e enraizamento	Ördögh, 2022
<i>Aechmea setigera</i>	Avaliar efeito do BAP na fisiologia durante micropropagação	Silva et al., 2022
<i>Bromelia balansae</i>	Efeito de diferentes qualidades de luz na micropropagação	Faria Souza et al., 2023

Alguns protocolos de brotação sugerem o processo de estiolamento da bromélia. O grande interesse na utilização do estiolamento na micropropagação está no fato de que os segmentos estiolados podem apresentar maior alongamento entre os nós (Barboza e Caldas, 2001), podendo, assim, serem facilmente separados, favorecendo a manipulação do material vegetal para obtenção de gemas axilares (Kerbaui et al., 1995, Suzuki et al., 2004).

Kiss et al (1995) propuseram a micropropagação por meio de segmentos nodais estiolados *in vitro* que foi inicialmente desenvolvida para o abacaxizeiro comestível (*Ananas comosus* Var. *comosus*). Estes pesquisadores conseguiram o estiolamento do abacaxizeiro usando 28° C na ausência de luz. Depois separaram os nós dos segmentos e inocularam em meio contendo 4,30 mgL<sup>-1</sup> de cinetina e 5,63 mgL<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP). Moreira e Pasqual (2002) e Barbosa e Caldas (2001) também reportaram em seus estudos o uso de estiolamento no cultivo *in vitro* dessa Bromeliaceae. Estes autores obtiveram brotação satisfatória das gemas quando utilizaram meio MS suplementado com 1,8 mgL<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA) e 2 mgL<sup>-1</sup> de BAP.

A indução do processo de brotação tem sido obtida por meio de uso de reguladores de crescimento (PGR), além de micronutrientes e macronutrientes presentes no meio de cultura (Rademacher, 2015). Entre os PGRs, as citocininas são frequentemente usadas para induzir a produção de brotos *in vitro*. Essas moléculas são responsáveis por uma série de processos biológicos que influenciam quase todos os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas (Hwang e Sheen, 2001). BAP é a citocinina mais utilizada na propagação *in vitro* devido a sua grande capacidade de atuar na parte aérea, produzindo muitos brotos em comparação com outros PGRs (Bekircan et al., 2018; Coelho et al., 2012; Komakech et al., 2020; Kornatskiy, 2020).

A capacidade de brotação em resposta às citocininas varia entre as espécies de bromélias, possivelmente devido a diferentes genótipos e, portanto, ao potencial organogênético. Os receptores celulares, como os receptores de citocinina, regulam a organogênese em um determinado tecido e desencadeiam os mecanismos moleculares de produção de brotos *in vitro*. Esses receptores de citocinina estão envolvidos na indução da organogênese da parte aérea (Sugiyama, 1999).

Alguns estudos relatam a produção de brotos *in vitro* por Bromeliaceae sem a necessidade de indutores exógenos (Arrabal et al., 2002; Santos et al., 2010) e outros mostram que os PGRs são essenciais para a micropropagação (Hirimburegama e Wijesinghe, 1992; Mercier e Nievola, 2003; Mendes et al., 2007; Pasqual et al., 2008; Viehmannova et al., 2016).

Por assemelhar-se a um fenômeno natural, pois muitas plantas se reproduzem assexuadamente por meio de brotação, o cultivo *in vitro* de gemas meristemáticas é um sistema mais facilmente controlado e apresenta fidelidade genética elevada (Grattapaglia e Machado, 1998).

Embora seja comum o relato do uso de reguladores de crescimento para a micropropagação, Tamaki et al. (2007) multiplicaram *Ananas comosus* cultivando gemas laterais oriundas de segmentos estiolados *in vitro* sem a necessidade de aplicações exógenas de

reguladores de crescimento. O mesmo foi obtido no trabalho de Santos et al. (2010) que também usaram a técnica de isolamento de gemas em caules estilados para criar um protocolo de micropropagação da bromélia *Acanthostachys strobilacea*. Segundo estas autoras, por meio deste protocolo é possível obter cerca de 80 plantas de uma única semente durante um período de 1 ano.

Nutrientes e temperatura também influenciam a micropropagação. No cultivo *in vitro*, alterações de micro e macronutrientes que compõem o meio de cultivo podem gerar variações significativas no desenvolvimento vegetal (Ramage e Williams, 2002). Gamborg (1970) e Sakuta (1987) já relataram que manipulações nas quantidades relativas de nitrato ou amônio podem ser críticas no processo de morfogênese e no crescimento dos tecidos.

Victório e Lage (2009) utilizaram meio MS modificado nas concentrações da fonte de nitrogênio para o cultivo *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* (Phyllanthaceae). Eles diminuíram pela metade o nitrato de amônio e o nitrato de potássio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ ). Este meio foi adequado por diminuir a hiperidricidade de algumas plantas, triplicar a porcentagem de enraizamento e aumentar a altura dos brotos.

No cultivo *in vitro* da bromélia *Vriesea incurvata*, Sasamori et al. (2016) observaram que ao reduzirem os macronutrientes, ou apenas os sais nitrogenados para 25% da concentração original do meio MS, houve um aumento no crescimento da parte aérea, na produção de folhas, na formação de raízes. Isto também favoreceu a sobrevivência das plântulas depois do período de aclimatização.

Andrade e Tamaki (2016) obtiveram melhores resultados no cultivo *in vitro* de *N. minutum* ao modificarem o meio MS nas concentrações de  $\text{KNO}_3$  ( $0,89 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $2,05 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $0,22 \text{ g L}^{-1}$ ) e quando estas autoras usaram  $0,38 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  e de  $4,65$  ou  $6,85 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (120 e 175 mM de nitrogênio, respectivamente) houve a formação de brotos em alguns indivíduos.

Muitos dos trabalhos relatam a obtenção de mudas mais vigorosas, a partir de brotos isolados, as quais teriam maiores chances de sobrevivência à retirada dos frascos para crescimento *ex vitro*, em vasos. Embora a maioria cite a composição do meio nutritivo como o fator indutor da multiplicação, de modo interessante, outros mostram que variações nas condições de temperatura já são suficientes para que haja indução da produção de brotos que pudessem ser isolados para produção de mudas. Arrabal et al. (2002), por exemplo, observaram alta frequência regenerativa da bromélia *Cryptanthus sinuosus* quando estas foram cultivadas por seis meses no meio MS, sem a presença de reguladores de crescimento, na temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . De modo semelhante, Kurita et al. (2014) relataram que, ao cultivarem *N. minutum in vitro* a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 40% das plantas apresentaram de três a quatro brotos ao final de seis meses de

incubação, o que não ocorreu nas plantas mantidas a 26 °C, nas quais não foi observada brotação. Todavia, essas pesquisadoras verificaram que a 26 °C houve maior porcentagem de germinação dessas bromélias o que indica que nem sempre a temperatura indutora de brotação é ideal para a etapa de germinação.

Tendo em vista que na natureza são vários os fatores, tanto bióticos quanto abióticos, que determinam os ciclos fenológicos das plantas (Talora e Morellato, 2000) e que os fatores como o fotoperíodo e temperatura estão dentre os fatores que influenciam a fenologia das bromélias (Benzing, 2000), induzindo alterações morfológicas relacionadas à propagação vegetativa ou à floração, é possível supor que *in vitro* certos fatores abióticos possam ser controlados visando melhorar a obtenção de brotos para produção de plantas. Sendo assim, o cultivo *in vitro* se mostra indicado para o estudo da influência desses fatores, pois é possível ajustar a temperatura, o fotoperíodo e a composição nutricional do meio de cultura de acordo com o objetivo da pesquisa, seja ela básica ou aplicada visando à produção de mudas para a conservação de Bromeliaceae.

Existem relatos de que a micropropagação cause má formação nas plantas obtidas *in vitro* (Hazarika, 2006), o que poderia indicar que as plantas estejam submetidas às condições tão diferentes do ambiente natural que desencadeiam respostas semelhantes àquelas ativadas em condições de estresse (Frank et al., 2004). Trabalhos mencionam a ativação do sistema antioxidante em plantas mantidas *in vitro* quando induzidas à brotação (Gupta e Datta, 2003; Piza et al., 2003; Konieczny et al., 2008; Elmongy et al., 2018), mas não foi relatado esse papel para *N. minutum*.

#### **1.1.4 Anatomia de bromélias cultivadas *in vitro***

Estudos anatômicos são importantes para avaliar os efeitos das condições *in vitro* no sucesso da transferência da planta para o ambiente *ex vitro* (Martins et al., 2016). Há vários trabalhos com bromélias, tanto ameaçadas de extinção quanto importantes no mercado ornamental, que avaliam como a condição *in vitro*, bem como os PGRs (Martins et al., 2020c; Rosa et al., 2018), concentração de sacarose (Martins et al., 2015) e outros carboidratos (Santos et al., 2020), tipo de vedação de frasco (Martins et al., 2015; 2020a), nutrientes (Martins et al., 2018), metais pesados (Cipriano et al., 2021), tempo de cultivo (Graneer et al., 2019), temperatura (Carvalho et al., 2003) podem interferir na anatomia dessas plantas.

As condições do cultivo *in vitro* podem causar anormalidades na anatomia e desordem estrutural (Moyo et al., 2015; Priyadharshini et al. 2020, Manokari et al, 2021; Jayaprakash et

al., 2023). Estas desordens compreendem estômatos não funcionais, teor reduzido de clorofila e baixa eficiência fotossintética, baixa formação de cera epicuticular, tecidos vasculares e mecânicos deficientes, baixa atividade metabólica, entre outras (Saez et al. 2012; Rodrigues et al. 2014). E conseqüentemente, mudas com estas disfunções morfoanatômicas e fisiológicas sofrem murcha, dessecação e maior taxa de mortalidade durante a aclimação (Machado et al. 2014).

Martins et al. (2020b) mostraram que a sacarose no meio de cultura pode induzir distúrbios fisiológicos em *Aechmea blanchetiana*, como um número menor de centros de reação ativos no fotossistema II. Em *Vriesea imperialis* foram verificadas modificações anatômicas nas folhas, como maior densidade de estômatos e escamas de tricomas, além de ser demonstrado que a sacarose pode induzir estresse osmótico nas plantas (Martins et al., 2020a). Estudo com *Aechmea bromeliifolia* mostrou que o ambiente *in vitro* influencia a textura e a espessura das folhas, a funcionalidade dos estômatos e a ultraestrutura dos cloroplastos (Silva et al., 2020).

Portanto, a avaliação anatômica de plantas micropropagadas é importante para compreender fases do crescimento e desenvolvimento da cultura e também poder identificar condições desequilibradas associadas à organogênese e assim melhorar o estabelecimento *in vitro* (Moyo et al., 2015). Por exemplo, Carvalho et al. (2019) estudaram as variações anatômicas em *N. minutum* cultivadas *in vitro* sob baixa temperatura e observaram que plantas cultivadas nessas condições apresentam parênquima aquífero e epidermes menos espessos do que quando as plantas são cultivadas à 25 °C.

## 1.2 Importância ecológica das bromélias

O microcosmo presente nos tanques das bromélias é bastante variado. Em um estudo para levantamento de algas verdes na Bahia foram identificados 23 táxons, incluindo três espécies que foram mencionadas pela primeira vez para o Brasil (Ramos et al., 2018). Ao investigar a água retida nas rosetas de *Aechmea ornata* e *Aechmea recurvata*, pesquisadores observaram 656 espécimes de invertebrados, inclusive uma espécie de esponja (Silva et al., 2021). Dezesesseis espécies de flagelados heterotróficos foram registradas em estudos com *Aechmea distichantha* situadas no Paraná (Mendes et al., 2019). Segundo Freire et al. (2021), 495 espécies de animais interagem com esta mesma espécie, incluindo vertebrados (Classes: Amphibia, Reptilia, Sauropsida, Aves e Mammalia) e invertebrados (Filos: Gastrotricha, Rotifera, Nematoda e Nematomorpha; Classes: Turbellaria, Gastropoda, Oligochaeta, Hirudinea, Arachnida, Crustacea, Chylozoa, Diplopoda e Insecta). A classe com mais espécies



e maior número de interações com *A. distichantha* é a Insecta, seguida de Arachnida. Por isso a família Bromeliaceae é de grande importância para o equilíbrio ecológico.

### 1.3 Característica que tornam as bromélias de interesse econômico

As bromélias são bastante empregadas como plantas ornamentais devido às suas inflorescências que duram meses e ao intrincado formato de suas folhas que apresentam detalhes variados muito apreciados pela população (Negrelle et al., 2012). O uso ornamental destas plantas teve início nos anos 1970. Na década de 90 houve um declínio no comércio das bromélias pela associação, em parte incorreta, destas plantas à reprodução do mosquito transmissor da dengue. Porém o mosquito não tem como local de reprodução preferencial as plantas desta família (Negrelle et al., 2012; Anacleto e Negrelle, 2013).

Estudo realizado pelo Cepea (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada), da Esalq/USP, em parceria com o IBraflor (Instituto Brasileiro de Floricultura) (CEPEA, 2022) mostra que o PIB da cadeia de flores e plantas ornamentais foi de R\$ 7,16 bilhões em 2017, ano da última divulgação do censo agropecuário. E as bromélias estão entre as plantas mais procuradas pelos consumidores deste mercado.

Contudo, a coleta predatória de exemplares para comercialização e a depredação de seu ambiente natural tem causado redução de inúmeras espécies destas plantas ou até mesmo levando-as à extinção (Pereira et al., 2008), sendo necessário investimentos em métodos de produção de mudas, sobretudo para espécies endêmicas, que sejam independentes do fornecimento de sementes do ambiente natural.

### 1.4 *Nidularium minutum*: uma bromélia terrícola ameaçada de extinção

*Nidularium minutum* (Fig. 1) é uma bromélia endêmica que ocorre exclusivamente no Estado de São Paulo (Leme, 2000; Martinelli et al., 2008). Possui um registro insólito para o estado do Paraná, feito em 1984 na Serra da Graciosa que não é citado em trabalhos mais recentes (CNCFlora, 2022). É uma espécie que foi considerada rara por Wanderley et al. (2009) e é classificada como vulnerável na Lista de Espécies Ameaçadas do Brasil do Ministério do Meio Ambiente (Brasil, 2022).

*N. minutum* é terrícola e rizomatosa de porte herbáceo (Fig. 1A) (Viana, 2007), ocorre preferencialmente no solo da Floresta Atlântica (Leme, 2000; Wanderley et al., 2007). Vive em solo da Mata Atlântica de encosta, região que perdeu extensas áreas de cobertura florestal

devido aos efeitos das atividades agrícolas, que acarretaram a perda de área e o declínio da qualidade do habitat (Rosa et al., 2021).

Estudos anatômicos já realizados com *N. minutum* analisaram raízes de plantas envasadas para o estudo da nutrição mineral (Carvalho et al., 2017) e folhas de plantas crescidas *in vitro* em baixas temperaturas (Carvalho et al., 2013), porém há poucos trabalhos que avaliam a anatomia desta espécie.

*N. minutum* possui potencial ornamental, com flores brancas e escapo longo com brácteas lanceoladas verdes com ápice vermelho, envolvendo totalmente o escapo (Wanderley e Moreira, 2007) (Fig. 1B).



Figura 1: *Nidularium minutum*. A: touceira na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba; B: planta em floração; C: flor; D: planta em ambiente natural brotando após predação do ápice por animais silvestres; E: planta em vaso brotando após floração. Setas indicam brotação (Teixeira, 2020).

Esta bromélia também se reproduz vegetativamente emitindo brotos após floração (Figura 1C) ou após sofrer predação de seu ápice por animais silvestres (Fig. 1D). Apesar de ser majoritariamente terrícola, em ambiente natural é possível encontrar espécimes com hábitos

de epífitas ocasionais, conforme observado por nosso grupo em visita a campo (Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba).

Sendo assim, o desenvolvimento de métodos de propagação dessa bromélia em laboratório para produção de mudas é de extrema importância para o repovoamento de habitats naturais ou mesmo para atender o mercado de ornamentais, o que pode desestimular a retirada ilegal de exemplares do ambiente natural, contribuindo assim para sua conservação.

Uma das maneiras de micropropagar é a brotação *in vitro* (Abdalla et al., 2022; Gago et al., 2022; Pandey et al., 2022). Os aspectos bioquímicos descritos para a brotação da planta têm sido associados, além de outros fatores, à presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas durante os processos (Schmidt e Schippers, 2015; Liskay et al., 2004; Fujita et al., 2006; Dunand et al., 2007; Tsukagoshi et al., 2010; Zeng et al., 2017). A ativação do sistema antioxidante tem sido considerada uma resposta das plantas micropropagadas à condição *in vitro* a qual foi relacionada a presença de estresse (Bednarek e Orłowska, 2019; Dutta Gupta e Agarwal, 2017; Ramadan et al., 2021).

Nosso grupo padronizou a técnica de análise de enzimas do sistema antioxidante e peroxidação lipídica para *N. minutum* quando o objetivo do trabalho foi identificar a tolerância desta espécie a variações térmicas (10 e 15 °C) (Carvalho et al., 2019). Os resultados deste estudo mostraram que a ativação do sistema antioxidante ajusta a produção de ROS em resposta ao estresse ambiental.

## 1.5 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

### 1.5.1 Formação das ROS

As espécies reativas de oxigênio podem ser radicais livres, espécies químicas capazes de existência independente que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, e espécies não radicais que podem facilmente reagir com radicais livres em organismos vivos e formarem outras ROS (Halliwell, 2006). São formadas durante o metabolismo celular aeróbio. Uma pequena parcela do oxigênio molecular ( $O_2$ ) (2 a 5%) pode sofrer redução, ganhando elétron, formando espécies reativas como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (Gill e Tuteja, 2010). Deste modo, as ROS são resultantes da excitação ou redução incompleta do oxigênio molecular (Halliwell, 2006).

O  $O_2$  em seu estado fundamental (estado mais estável) possui dois elétrons com mesmo número quântico de spin, isto é, os spins são paralelos. Deste modo, não é comum o  $O_2$  oxidar

espécies não radicais, pois estas espécies possuem os dois elétrons da última camada com spins opostos ( $+1/2$  e  $-1/2$ ). Sendo assim, essa condição de spins faz com que o  $O_2$  molecular receba elétrons um de cada vez. Isto ajuda a explicar por que o  $O_2$  reage lentamente com a maioria dos não radicais e muitas vezes reage extraordinariamente rápido com outros radicais por transferência de um único elétron na formação das ROS (Hallier et al., 2006).

Nas células vegetais, os principais locais de geração de ROS são os tilacoides dos cloroplastos, centro de reação dos fotossistemas I e II por possuírem compartimento rico em oxigênio, redutores e intermediários de alta energia (Asada, 2006). Porém, a produção de ROS tem outros vários locais e fontes, incluindo, mitocôndrias, peroxissomos, retículo endoplasmático e membranas plasmáticas (Gechev et al., 2006; Foyer e Noctor, 2009).

No fotossistema II, quando a cadeia de transporte de elétrons fotossintética é reduzida, forma-se radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Zolla e Rinalducci, 2002; Krieger-Liszky, 2005). No entanto, o principal mecanismo de produção de  $O_2^{\bullet-}$  nos cloroplastos é pela redução de  $O_2$  pelo sistema fotossintético I (Asada, 2006; Pospíšil, 2009).

### 1.5.2 As ROS e o estresse oxidativo

Em circunstâncias desfavoráveis, de estresse, as plantas geram um grande número de ROS (Pérez e Lira, 2005). O acúmulo das ROS no tecido vegetal pode causar estresse oxidativo, termo inicialmente introduzido por Cadenas (1985). O estresse oxidativo implica uma interrupção do equilíbrio redox. Uma versão desta definição pode ser “desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular” (Sies, 2018). Estudos têm sido feitos para classificação dos estresses oxidativos e da homeostase das ROS (Lushchak, 2016; Sies, 2015).

As ROS podem oxidar e modificar componentes celulares, impedindo as execuções de suas funções, bem como causar reações irreversíveis no desenvolvimento de tecidos e órgãos, muitas vezes levando ao crescimento anormal da planta ou à morte (Apel e Hirt, 2004; Mittler, 2017; Tognetti et al., 2017).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), por exemplo, é uma ROS moderadamente reativa, com uma meia-vida relativamente longa (1 ms) e cujo pequeno tamanho permite a travessia de membranas celulares e migrar em compartimentos diferentes. Dessa forma, difunde os danos e também atua como um mensageiro da condição de estresse. O  $H_2O_2$  tem uma ação deletéria, porque participa da reação formadora de  $OH^{\bullet}$ , o oxidante mais reativo na família das ROS. Além disso, o  $H_2O_2$  é capaz de inativar enzimas por oxidação de seus grupos tiol (Gadjev et al., 2008; Karuppanapandian et al., 2011). A  $OH^{\bullet}$ , por sua vez, é considerado a mais oxidante dentre

as ROS e sua alta reatividade resulta em reações rápidas e inespecíficas com distintos substratos, podendo potencialmente reagir com todos os tipos de moléculas biológicas (Aguiar e Ferraz, 2007; Mylona e Polidoros, 2010). Esta ROS pode ocasionar modificações nas bases nitrogenadas em sistemas biológicos, levando à inativação ou mutação do DNA; desnaturar proteínas pela oxidação de grupos sulfidril (-SH) e pontes dissulfeto (-SS), além de causar danos a moléculas de carboidratos e retirar átomos de hidrogênio de grupos metileno de ácidos graxos poli-insaturados, dando início à peroxidação lipídica (Blokhina et al., 2003; Barreiros, 2006).

### **1.5.3 Sinalização por Espécies Reativas de Oxigênio**

As ROS são consideradas por muitos autores subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbico. Porém, esta visão é falha e limita os conceitos em relação à produção, acumulação, funções e destino destas espécies (Mittler, 2017). Muitos estudos se concentram nos papéis benéficos das ROS em muitos processos vegetais essenciais, particularmente na comunicação célula a célula, proliferação celular, crescimento e respostas ao estresse (Huang et al., 2019; Mhamdi e Breusegem, 2018), funções que demonstram que as ROS são essenciais marcadores ou sinalizadores de células vivas (Breusegem et al., 2018).

Em concentrações ideais, as ROS desempenham um papel positivo no desenvolvimento normal da planta e na resposta aos estresses ambientais (Bakalova, Nikolova e Nedeva, 2004). Em baixos níveis, as ROS são necessárias para desencadear vários processos biológicos básicos (Gill e Tuteja, 2010; Tsukagoshi et al., 2010; Zeng et al., 2017).

Deste modo, é de grande importância que o nível basal das ROS permaneça acima do citostático e abaixo do citotóxico, o que permite a regulação de processos essenciais (Dumanovic et al., 2021).

As ROS podem modificar ou limitar a morfogênese, além de estarem envolvidas na liberação de dormência em gemas meristemáticas (Huang et al., 2019; Zeng et al., 2019). Além do mais, as ROS juntamente com hormônios, controlam os processos de desenvolvimento da planta. Elas atuam como sinalizadores intrínsecos de crescimento e desenvolvimento ativando muitos processos essenciais de desenvolvimento, como crescimento de pelos radiculares, alongamento radicular e gravitropismo (juntamente com a auxina), fechamento estomático (através de ácido abscísico, ABA), síntese de lignina (através do ácido jasmônico), forma da folha, desenvolvimento de tricomas, germinação de sementes (Beauvieux et al., 2018).

Foreman et al. (2003) relataram que a produção de ROS na região de crescimento das células da raiz indica a relação das ROS com o mecanismo de formação radicular.

Evidências sugerem que a produção de ROS, estimulada pelo estresse celular, oxidativo e respiratório, é de extrema importância para o desenvolvimento das plantas e estão envolvidas na liberação de dormência de gemas (Beauvieux et al., 2018). Pérez e Lira (2005) observaram que o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  precede a quebra da dormência em brotos de videira (*Vitis vinifera* L.). Os autores inferiram que um aumento da concentração de  $H_2O_2$  ativa vias que induzem a expressão de genes relacionados à brotação.

Sendo assim, as ROS podem ter o papel de marcadores de estresse apontando fatores que modificam ou limitam a morfogênese. De acordo com Piza et al. (2003), essas moléculas podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos, possibilitando transpor a subjetividade da identificação visual da morfogênese *in vitro* e auxiliar na identificação precoce destes processos, como a formação de brotos, por exemplo.

Existem, porém, evidências de seu papel regulatório no crescimento radicular e foliar, bem como no afrouxamento da parede celular, possivelmente decorrente da degradação de polissacarídeos, induzida pelo  $OH^\bullet$  (Mylona e Polidoros, 2010; Faure et al., 2012).

#### **1.5.4 Enzimas do sistema antioxidante durante a micropropagação**

Os níveis ideais de ROS são mantidos por um sistema antioxidante, constituído por enzimas ou outros compostos que decompõem as ROS.

A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima do sistema antioxidante, pois converte o  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), outra espécie reativa (Wang et al., 1991). A catalase (CAT) é uma das principais enzimas que degradam o  $H_2O_2$ , convertendo o peróxido em água e oxigênio. Outras enzimas que também degradam  $H_2O_2$  são as peroxidases de guaiacol (POD) e ascorbato (APX) (Pérez e Lira, 2005; Polidoros e Scandalios, 1999; Shulman et al., 1986).

As peroxidases, enzimas que degradam o  $H_2O_2$ , podem participar do controle de crescimento, desenvolvimento, diferenciação e morfogênese (Dumanovic, 2021). Bajji et al. (2007) mostraram que a inibição da CAT resulta na aceleração da cinética de germinação e no aumento do número de brotações em tubérculos de batata, resultado que reforça a importância de  $H_2O_2$  no processo de brotação.

O papel das enzimas antioxidantes durante a organogênese e embriogênese somática em algumas espécies já foi relatado (Mathur et al., 2008, Dutta Gupta e Datta, 2003; Meratan et al., 2009; Misra et al.; 2010, Sharifi e Ebrahimzadeh, 2010). Há na literatura algumas pesquisas

que visam entender a relação entre estresse oxidativo e morfogênese vegetal no cultivo *in vitro*. Elmongy et al. (2018), por exemplo, perceberam que há correlação significativa entre a atividade das enzimas POD, CAT, APX e SOD no desenvolvimento de raízes de azaleia cultivada *in vitro* em meio de cultura acrescido de ácido húmico. No trabalho de Anderson (1986), foi observada que a baixa atividade de peroxidases esteve relacionada à perda do potencial morfogênico de células de *Rhododendron* cultivadas *in vitro*. O mesmo foi observado por Bonfill et al. (2003) em calos de ginseng. Por outro lado, uma correlação positiva entre o aumento dessa enzima e a morfogênese em calos de laranjeiras já foi reportada por Kochba e Spiegel – Roy (1977).

Zhang et al. (2010), ao cultivarem células de *Larix leptolepis*, reportaram que há relação entre as atividades de CAT, POD, APX e SOD e o desenvolvimento das fases da embriogêneses.

Gupta e Datta (2003), ao cultivarem gladiolo *in vitro*, perceberam que houve gradual incremento de SOD durante a embriogênese, por outro lado, a atividade de CAT decresceu. Já na fase de formação de brotos, ocorreu o contrário, aumento da atividade de CAT e diminuição de SOD. Assim eles concluíram que há relação entre estresse oxidativo nas fases da embriogênese e da organogênese no cultivo *in vitro* daquela planta.

Piza et al. (2003) observaram um aumento de atividades de peroxidases justamente quando ocorreu emissão desordenada de novos brotos e ausência de enraizamento ao estudarem abacaxizeiro em situação de estresse inoculado em meio com alta concentração de cloreto de sódio.

A hipótese deste estudo está baseada na possibilidade do potencial de brotação da bromélia *N. minutum* ser regulado por alterações de eventos oxidativos devido à perturbação no nível de estado estacionário das ROS, resultante da presença ou não de indutor de brotação no meio de cultura.

## **1.6 Objetivo Geral**

Investigar o envolvimento das enzimas do sistema antioxidante no processo de multiplicação *in vitro* da bromélia *N. minutum* por brotação relacionando-o a características anatômicas.

### **1.6.1 Objetivos Específicos**



- Estabelecer método de produção de mudas de *N. minutum* a partir da micropropagação, visando a aclimatização das plantas obtidas *in vitro*.
- Verificar a influência de reguladores de crescimento na micropropagação de *N. minutum*;
- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes envolvidas na brotação de *N. minutum*;
- Analisar as alterações anatômicas durante a brotação *in vitro* da *N. minutum*.

## 1.7 ATIVIDADES EXPERIMENTAIS

O projeto desta tese foi dividido em três fases experimentais. A primeira constituiu em estipular um protocolo de brotação *in vitro* para micropropagação de *Nidularium minutum* usando plântulas obtidas a partir de sementes armazenadas em geladeiras ou colhidas de plantas encontradas na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba.

Foram testados vários métodos a fim de intensificar a brotação *in vitro* da bromélia, como por exemplo, diferentes concentrações de nitrogênio em meio de cultura, alta temperatura e diferentes concentrações de BAP e ANA.

Os resultados obtidos nesta fase geraram o artigo “Differential sprouting ability during micropropagation of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)” que se encontra no capítulo I desta tese.

Tendo determinado o protocolo de brotação *in vitro* de *N. minutum*, foi dado início a segunda fase, quando foram analisadas as atividades enzimáticas e as alterações anatômicas durante a brotação *in vitro* desta bromélia. Esta fase do projeto resultou no artigo, “Dinâmica da atividade de enzimas antioxidantes e alterações anatômicas durante a brotação *in vitro* de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)” que compõe o capítulo II.

Na terceira fase do projeto foram feitas análises de estruturas anatômicas da *N. minutum* para identificar quais são os caracteres desta bromélia que lhe conferem alta taxa de sobrevivência durante a aclimatização após cultivo *in vitro* e deram origem ao capítulo III.

A figura 2 sumariza as etapas do desenvolvimento experimental do projeto.



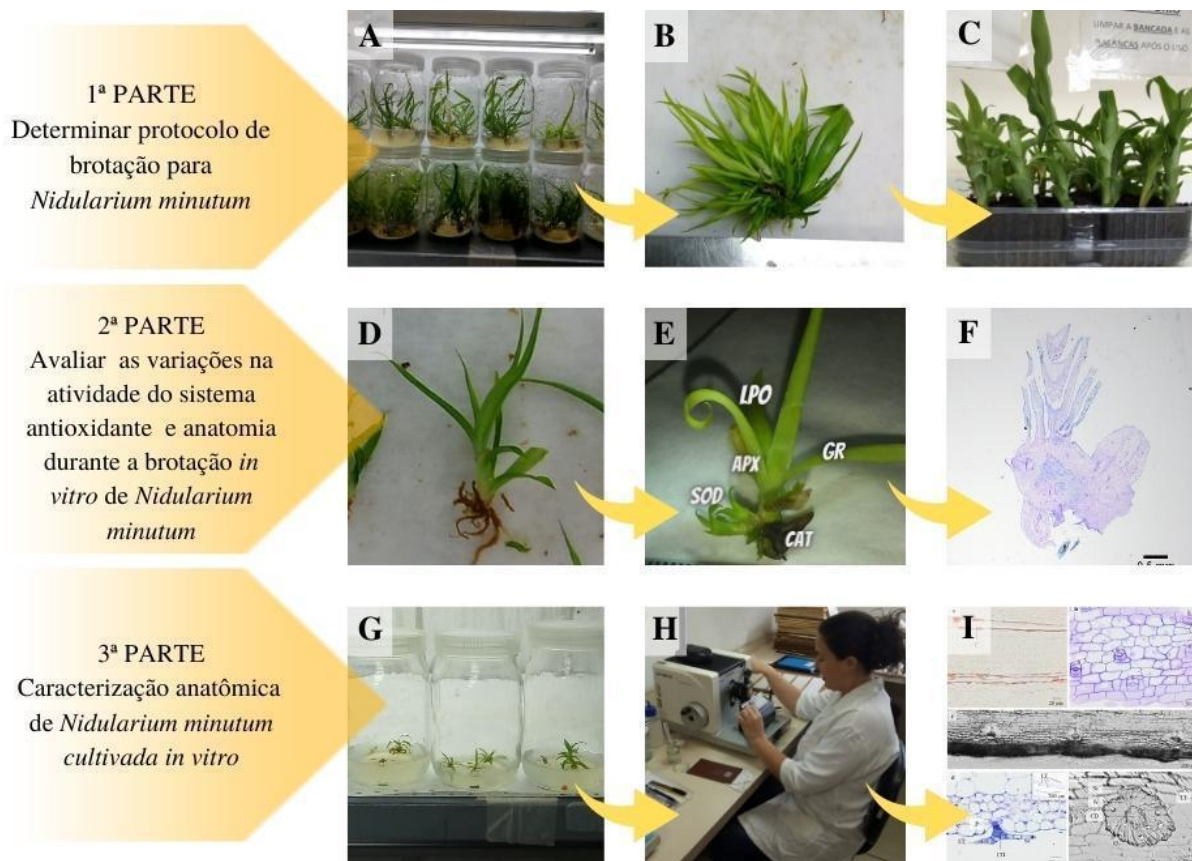


Figura 2: Etapas do experimental do trabalho com *Nidularium minutum* que foi dividido em duas partes. A-C: primeira parte; D-F: segunda parte; G-I: terceira parte. A – Visão geral da planta *Nidularium minutum* *in vitro*; B – Plantas de *N. minutum* com brotos após 240 dias de cultivo em meio MS com BAP; C – Plantas de *N. minutum* aclimatizadas; D – Planta de *N. minutum* cultivada por 90 dias em meio MS sem PGR; E – *N. minutum* cultivada em meio para brotação; F – Corte longitudinal de *N. minutum* com brotos aos 90 dias de cultivo; G – Planra de *N. minutum* cultivada em MS sem reguladores de crescimento aos 90 dias ; H – Processo de preparação de lâminas histológicas; I – Cortes anatômicos da planta de *N. minutum* cultivada em meio MS por 90 dias.

## 1.8. CONTRIBUIÇÃO DO PRESENTE ESTUDO PARA CONSERVAÇÃO DAS BROMÉLIAS

As bromélias são extremamente importantes para a manutenção e equilíbrio do ecossistema de seu habitat. Por serem plantas atrativas e apreciadas pela população, há um extrativismo predatório de muitas destas plantas que correm o risco de serem extintas. A situação é mais crítica para as bromélias endêmicas, pois muitas são de matas ou florestas que estão sendo devastadas.

Visto que a *Nidularium minutum* é uma bromélia endêmica do Alto da Serra de Paranapiacaba e classificada como vulnerável na Lista de Espécies Ameaçadas do Brasil

divulgada pelo Ministério do Meio Ambiente (Brasil, 2022), é de suma importância que se obtenha um protocolo de propagação eficiente para essa espécie.

Vários estudos mostram a possibilidade de indução da multiplicação *in vitro*, entretanto poucos são os que aprofundam os mecanismos fisiológicos/bioquímicos envolvidos nesse processo. Portanto, conhecer quais são os fatores bióticos e abióticos, como também os mecanismos bioquímicos envolvidos na micropropagação de *N. minutum*, contribui para revelar possíveis respostas de estresse envolvidas com a mudança de padrão reprodutivo, relacionada à produção de brotos. Vale ressaltar que a brotação lateral em muitas espécies de bromélias ocorre após a floração da planta mãe, originando-se à medida que esta entra em senescência (Leme e Marigo, 1993). Há espécies de bromélias que florescem quando submetidas às condições de estresse (Ahmad e Prasad, 2011; Mekers et al., 1982). No caso da brotação induzida *in vitro*, não há florescimento, o que reforça ainda mais a possibilidade de que esse processo esteja relacionado à ativação de respostas análogas às dos estresses aos quais as bromélias são submetidas em condições naturais.

Nesse contexto, as enzimas do sistema antioxidante têm sido citadas como importantes marcadores bioquímicos que sinalizam a brotação de gemas em plantas cultivadas *in vitro*.

Por fim, avaliar a sobrevivência *ex vitro* das mudas produzidas por meio da micropropagação pode indicar a eficiência de todos os métodos testados, contribuindo para a seleção do melhor protocolo de multiplicação dessa espécie endêmica. Além do mais, poderia representar a capacidade que essa espécie possui de continuar seu desenvolvimento apesar do possível estresse induzido durante sua multiplicação *in vitro*, revelando ajustes importantes às alterações abióticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M.K., El-Mahrouk, M.E., Taha, N., Bayoumi, Y., Dobránszki, J. 2022. An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. *Horticulturae*, 8:677.

Aguiar, A.; Ferraz, A. 2007. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Química Nova*, 30:623-628.

Ahmad, N.; Faisal, M. 2018. Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator. Springer, Singapura.

- Ahmad, P.; Prasad, M.N.V. 2011. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Springer Science e Business Media, Singapura.
- Alexander, A., Gansau, J.A., David, D. 2021. *In vitro* seed germination of *Coelogyne asperata* Lindl.(Orchidaceae). Transactions on Science and Technology, 8:1-6.
- Anderson, W.C.A. 1986. A revised medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 109: 343-347.
- Andrade, S. V.; Tamaki, V. 2016. *In vitro* growth of *Nidularium minutum* mez (Bromeliaceae) in different concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium. Journal of Plant Nutrition, 39:1634-1643.
- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society 181:1-20.
- Arrabal, R., Amancio, F., Carneiro, L.A., Neves, L.J., Mansur, E. 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (LB Smith) for in vitro preservation. Biodiversity and Conservation, 11:1081-1089.
- Arrigoni-Blank, M. D. F., Vasconcelos, M. R. M., Feitosa-Alcantara, R. B., Moreira, M. A., Castro, E. M. D., Blank, A. F.. 2018. Influence of NPK fertilization at the acclimatization stage on micropropagated seedlings of *Tillandsia bulbosa* Hook. Bioscience Journal, 34:648-656.
- Aruoma, O.I. 1999. Free radicals, antioxidants and international nutrition. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 8:53-63.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology. 141:391–396.
- Bajji, M., M'Hamdi, M., Gastiny, F., Rojas-Beltran, J.A., Du Jardin, P. 2007. Catalase inhibition accelerates dormancy release and sprouting in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 11:121-131.
- Bakalova, S., Nikolova, A., Nedeva, D. 2004. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Bulgarian Journal of Physics. 30: 64–77.

- Barbosa, M.R., Silva, M.M.D.A., Willadino, L., Ulisses, C., e Camara, T.R. 2014. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, 44:453-460.
- Barboza, S.B.S.C.; Caldas, L.S. 2001. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 417- 423,
- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29:113-123.
- Beauvieux, R., Wenden, B., Dirlwanger, E. 2018. Bud dormancy in perennial fruit tree species: a pivotal role for oxidative cues. *Frontiers in Plant Science*, 9: 657.
- Bednarek, P.T., Orłowska, R. 2020. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi) genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140: 245-257.
- Benzing D. H. 1980. *The Biology of Bromeliads*. Mad River Press. California.
- Benzing, D.H. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press. Cambridge, 690p.
- Bertsouklis, K., Panagaki, K.P. 2022. *In vitro* germination and propagation of *Dyckia brevifolia*, an ornamental and endangered bromeliad. *Horticulturae*, 8:390.
- Biemelt, S., Keetman, U., Mock, H.P., Grimm, B. 2000. Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. *Plant, Cell e Environment*, 23:135-144.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91:179-194.
- Bonfill, M., Cusidó, R M., Palazón, J., Canut, E.; Piñol, T., Morales, T. 2003. Relationship between peroxidase activity and organogenesis em *Panax ginseng* callases. *Pant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 37-41.

- Breusegem, F., Foyer, C.H. e Mann, G. 2018. Reactive oxygen species are crucial "pro-life" survival signals in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 122:1–3.
- Bridgen, M.; van Houtven, W.; Eeckhaut, T. Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. In *Ornamental Crops, Handbook of Plant Breeding*; Van Huylenbroeck, J., Ed.; Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, 2018; pp. 127–144.
- Carvalho C.P. Tolerância ao frio e de-aclimatação em plantas de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae). 2017. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica. Disponível em: [http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2018/02/camila\\_pereira\\_de\\_carvalho\\_dr.pdf](http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2018/02/camila_pereira_de_carvalho_dr.pdf)
- Carvalho, A.C.P.P., Pinheiro, M., Dias, G., Barros, L.D.M. 2011. Estiolamento *in vitro*: uma alternativa para a produção de mudas micropropagadas de antúrio. *Embrapa Agroindústria Tropical - Circular Técnica*, 36.
- Carvalho, C.P., Hayashi, A.H., Braga, M.R., Nievola, C.C. 2013. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 71:144-154.
- Carvalho, G.R. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. 1999. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 23:483-490.
- Carvalho, J.L., Hayashi, A.H., Kanashiro, S., Tavares, A.R. 2017. Anatomy and function of the root system of bromeliad *Nidularium minutum*. *Australian Journal of Botany*, 65:550-555.
- CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, 2022. <https://www.cepea.esalq.usp.br/br>.
- Cipriano, R., Martins, J.P.R., Conde, L.T., Moreira, S.W., Clairvil, E., Braga, P.D.C.D.S., Falqueto, A.R. 2021. Anatomical, physiological, and biochemical modulations of silicon in *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultivated *in vitro* in response to cadmium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147: 271-285.
- CNCFlora. *Nidularium minutum* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Nidularium\\_minutum](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Nidularium_minutum)>. Acesso em 6 outubro 2022.

- Dhiman, K.M., Sharma, L., Singh, A., Sharma, M.M. 2020. *Ex situ* conservation using *in vitro* methods of an endangered plant *Sterculia urens* Roxb.: a high volume trade plant for Gum. Ind. Crops Prod. 158:113015.
- Dumanovic, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., Jaćević, V. 2021. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in Plant Science*, 11:552969.
- Dunand C., Crèvecoeur M., Penel C. 2007. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist* 174:332-341.
- Dutta Gupta, S., Agarwal, A. 2017. Influence of LED lighting on *in vitro* plant regeneration and associated cellular redox balance. In *Light emitting diodes for agriculture* (pp. 273-303). Springer, Singapore.
- Eggl, U, Gouda, E.J. 2020. Bromeliaceae. *Monocotyledons*, p. 835-847.
- Elmongy, M.S., Zhou, H., Cao, Y., Liu, B., e Xia, Y. 2018. The effect of humic acid on endogenous hormone levels and antioxidant enzyme activity during *in vitro* rooting of evergreen azalea. *Scientia Horticulturae*, 227:234-243.
- Faria Souza, M.J.M., Thomaz, D.V., Carneiro, L.A., de Aguiar, D.V.A., Vaz, B.G., Sousa, C. M., e dos Santos, P.A. 2023. *In vitro* micropropagation of *Bromelia balansae* Mez.: effects of light intensity and growth regulators on plant development. *Research, Society and Development*, 12:e18212340518-e18212340518.
- Faure, A.M., Andersen, M.L., Nyström, L. 2012. Ascorbic acid induced degradation of betaglucan: Hydroxyl radicals as intermediates studied by spin trapping and electron spin resonance spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 87:2160-2168.
- Flores, R., Kraetzig, L. C., Flôres, P. Z., Pereira, D. N., Büneker, H. M., Maldaner, J., Strahl, M.A. 2018. Propagation of *Dyckia vicentensis*, an endemic bromeliad of the Pampa biome, Brazil. *Rodriguésia*, 69:2229-2235.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Dolan, L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422:442-446.

- Fortini, E.A., Batista, D.S., Mamedes-Rodrigues, T.C., Felipe, S.H.S., Correia, L.N.F., Chagas, K., Silva, P.O., Rocha, D.I., Otoni, W.C. 2021. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 144:593–605.
- Foyer, C.H., Hanke, G. 2022. ROS production and signaling in chloroplasts: Cornerstones and evolving concepts. *The Plant Journal*, 111:642-661.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 11:861–905.
- Frank, T., Kavers, C., Gaspar, T., Dommès, J., Deby, C., Greimess, R., Didier, S., Duspont, G.D., 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiol. Biochem.* 42:519– 527.
- Freire, R.M., Montero, G.A., Vesprini, J.L., Barberis, I.M. 2021. Review of the interactions of an ecological keystone species, *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae), with the associated fauna. *Journal of Natural History*, 55:283-303.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*, 9:436-442.
- Gadjev, I. et al. 2008. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 270:87-144.
- Gago, D., Sánchez, C., Aldrey, A., Christie, C.B., Bernal, M.Á., e Vidal, N. 2022. Micropropagation of Plum (*Prunus domestica* L.) in bioreactors using photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Horticulturae*, 8:286.
- Gamborg, O.L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. 1970. *Plant Physiology*, Lancaster, 45:372-375.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., Laloi, C., 2006. Reactive oxygen species signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28:1091–1101.

Gouda, E.J., Butcher, D. e Gouda, C.S. (cont. updated) Encyclopaedia of Bromeliads, Version 4. <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> Utrecht University Botanic Gardens (accessed: [03/07/2023]).

Graner, E.M., Calderan-Meneghetti, E., Leone, G.F., Almeida, C., Almeida, M. 2019. Long-term *in vitro* culture affects phenotypic plasticity of *Neoregelia johannis* plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137:511-524.

Grattapaglia, D., Machado, M.A. Micropropagação. 1998. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, 1, 183-260.

Gupta, N., Jain, V., Joseph, M.R., Devi, S. 2020. A review on micropropagation culture method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8:86-93.

Gupta, S. D., Datta, S. 2003. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of *gladiolus* and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biologia Plantarum*, 47:179-183.

Haberlandt G. 1902. *Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen*, sitz-ungsber. Akad. D. wissensch. Mathematisch-naturwissenschaftlicher Klasse, 169. Bridgen, M. P., Houtven, W. V., e Eeckhaut, T. (2018). Plant tissue culture techniques for breeding. In *Ornamental Crops* (pp. 127-144). Springer, Cham.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141: 312-322.

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

Huang, Ping-Lung et al. 2011. 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.

Huang, X., Chen, S., Li, W., Tang, L., Zhang, Y., Yang, N., Xu, C. 2021. ROS regulated reversible protein phase separation synchronizes plant flowering. *Nature Chemical Biology*, 17: 549-557.

Jayaprakash, K., Manokari, M., Cokulraj, M., Dey, A., Faisal, M., Alatar, A. A., Shekhawat, M.S. 2023. Improved organogenesis and micro-structural traits in micropropagated plantlets



of *Caralluma umbellata* Haw. in response to Meta-Topolin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-14.

Juras, M.C.R., Jorge, J., Pescador, R., Ferreira, W.D.M., Tamaki, V., Suzuki, R.M. 2019. *In vitro* culture and acclimatization of *Cattleya xanthina* (Orchidaceae), an endangered orchid of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Rodriguésia*, 70.

Kämpf, A.N. 2005. Produção comercial de plantas ornamentais. *Agrolivros*, 2 ed., 2005, 256p.

Karakas, F.P.; Bozat, B.G. 2020. Fluctuation in secondary metabolite production and antioxidant defense enzymes in *in vitro* callus cultures of goat's rue (*Galega officinalis*) under different abiotic stress treatments. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*142:401–414.

Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5:709-725.

Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5:709-725.

Khan, P.S.V.; Kozai, T.; Nguyen, Q.T.; Kubota, C.; Dhawan, V. 2003. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biologia Plantarum*, 46:161-166.

Kiss, E., Kiss, J., Gyulai, G., Heszky, L.E. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience*, 30:127- 129.

Knudson L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot Gaz* 73:1–25.

Kochba, J.L., Spiegel-Roy, P. 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic “Shamount” Orange ovular callus line. *Plant Cell Physiology*, 18:463-467.

Konieczny, R., Libik, M., Tuleja, M., Niewiadomska, E.; Miszalski, Z. 2008 Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30:71-79.

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

- Krieger-Liszkay, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56:337–346.
- Kukulczanka, K., e Czastka, B. 1988. Propagation of some species of the Bromeliaceae family cultured *in vitro*. In III International Symposium on Growth Regulators in Ornamental Horticulture, 251:167-172.
- Kumar, M.K.; Sandeep, B.V.; Rao, S.P. 2018. Development of salt tolerant callus cultures by somatic hybridization between *Oryza sativa* and mangrove grass *Myriostachya wightiana*. *Annals of Agrarian Science*, 16:396–404.
- Kurita, F.M.K., Mello Machado, B., Teixeira, N.B., Abreu César, C.G., Nievola, C.C., Tamaki, V. 2014. Fenologia, cultivo *in vitro* e aclimatização da bromélia ameaçada de extinção *Nidularium minutum* Mez. *Biotemas*, 27:59-69.
- Kyzioł, A.; Łukasiewicz, S.; Sebastian, V.; Kustrowski, P.; Kozieł, M.; Majda, D.; Cierniak, A. 2021. Towards plant-mediated chemistry— Au nanoparticles obtained using aqueous extract of *Rosa damascena* and their biological activity *in vitro*. *J. Inorg. Biochem*, 214:111300.
- Leme, E.M.C., Marigo, L.C. 1993. Bromélias na natureza. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual, Rio de Janeiro. 183 p.
- Leme, E.M.C. 2000. *Nidularium*: Bromeliads of The Atlantic Forest. Rio de Janeiro, Sextante Artes.
- Lima, A.P.P.S., Brito, A.L., Santana, J.R.F.D. 2020. Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. *Ciência Rural*, 50:e20180922.
- Liszkay, A., van der Zalm, E., Schopfer, P. 2004. Production of reactive oxygen intermediates ( $O^{2-}$ ,  $H_2O_2$ , and  $OH^-$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant physiology*, 136:3114-3123.
- Lushchak, V.I. 2016. Time-course and intensity-based classifications of oxidative stresses and their potential application in biomedical, comparative and environmental research. *Redox Report*, 21:262-270.
- Machado M.P, Silva A.L.L., Biasi L.A., Deschamps C., Filho J.C.B., Zanette F. 2014. Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot tip necrosis of *in vitro*

- regenerated shoots of *Lavandula angustifolia* Mill. Brazilian Archives of Biology and Technology. 57:636–643.
- Mamede, M.C.H., Souza, V.C., Prado, J., Barros, F., Wanderley, M.G.L.; Rando, J.G. 2007. Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas de Extinção no Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Manokari, M., Priyadharshini, S., Shekhawat, M. S. 2021. Micro-Structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. Microscopy and Microanalysis, 27:626-634.
- Marković, M., Grbić, M., Đunisijević-Bojović, D. 2019. Effects of medium pH and carbohydrate source on the *in vitro* propagation of the endangered metallophyte *Dianthus pinifolius* Sibth. et Sm. Propagation of Ornamental Plants, 19:72-84.
- Mathur, P., Vadez, V., Sharma, K.K. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. Plant Cell Reports, 27:411-424.
- Martinelli, G., Vieira, C.M., Gonzalez, M., Leitman, P., Piratininga, A., Costa, A.F.D., Forzza, R.C. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. Rodriguésia, 59:209-258.
- Martins, J.P.R., Verdoodt, V., Pasqual, M., Proft, M. 2015. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 123:121-132.
- Martins, J.P.R., Rodrigues, L.C.D.A., Conde, L.T., Gontijo, A.B.P.L., Falqueto, A.R. 2020a. Anatomical and physiological changes of *in vitro*-propagated *Vriesea imperialis* (Bromeliaceae) in the function of sucrose and ventilated containers. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 154:87-99.
- Martins, J.P.R., Rodrigues, L.C.A., Santos, E.R., Gontijo, A.B.P.L., Falqueto, A.R. 2020b. Impacts of photoautotrophic, photomixotrophic, and heterotrophic conditions on the anatomy and photosystem II of *in vitro*-propagated *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Sm. (Bromeliaceae). *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 56:350-361.
- Martins, J.P.R., Rodrigues, L.C.D.A., Silva, T.D.S., Gontijo, A.B.P.L., Falqueto, A.R. 2020c. Modulation of the anatomical and physiological responses of *in vitro* grown *Alcantarea imperialis* induced by NAA and residual effects of BAP. Ornamental Horticulture, 26:283-297.

- Martins, J.P.R., Rodrigues, L.C.A., Santos, E.R., Batista, B.G., Gontijo, A.B.P.L., Falqueto, A.R. 2018. Anatomy and photosystem II activity of *in vitro* grown *Aechmea blanchetiana* as affected by 1-naphthaleneacetic acid. *Biologia Plantarum*, 62: 211-221.
- Martins, J.P.R., Rodrigues, L.C.D.A., Silva, T.D.S., Santos, E.R., Falqueto, A.R., Gontijo, A. B.P.L. 2019. Sources and concentrations of silicon modulate the physiological and anatomical responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) during *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137:397-410.
- Martins, J.P.R., Schimildt, E.R., Alexandre, R.S., Castro, E.M., Nani, T.F., Pires, M.F., Pasqual, M. 2014. Direct organogenesis and leaf-anatomy modifications *in vitro* of *Neoregelia concentrica* (Vellozo) LB Smith (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany*., 46:2179-2187.
- Martins, J.P.R., Martins, A.D., Pires, M.F., Braga Junior, R.A., Reis, R.O., Dias, G.D.M.G., Pasqual, M. 2016. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126:43-57.
- Mekers, O. 1977. *In vitro* propagation of some *Tillandsioideae* (Bromeliaceae). In Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes, 78: 311-320.
- Mekers, O., Proft, M., Jacobs, L. 1982. Prevention of unwanted flowering of ornamental Bromeliaceae by growth regulating chemicals. *Growth Regulators*, XXI IHC, 137: 217-224.
- Mendes, P.M., Lansac-Tôha, F. M., Meira, B.R., Oliveira, F.R., Velho, L.F.M., Lansac-Tôha, F.A. 2019. Heterotrophic flagellates (*Amorpha* and *Diaphoretiches*) in phytotelmata bromeliad (Bromeliaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 80:648-660.
- Mercier, H., Kerbauy, G.B. 1997. Micropropagation of Ornamental Bromeliads (Bromeliaceae). In: High-Tech and Micropropagation VI. Springer Berlin Heidelberg, pp. 43-57.
- Moraes, L.M., Cavalvante, L.C.D., Faria, R.T. 2002. Substratos para aclimatização de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. *Acta Scientiarum*, 24:1397-1400.
- Moreira, M.A., Pasqual, M., Carvalho, J.G.D., e Fráguas, C. B. 2003. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, 27:1002-1006.

- Moyo M., Aremu A.O. e Van Staden J. 2015. Insights into the multifaceted application of microscopic techniques in plant tissue culture systems. *Planta*, 242:773–790.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol* 25:135–166. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15:473–497.
- Mylona, P.V., Polidoros, A.N. 2011. ROS regulation of antioxidant genes. In: Gupta, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, 6:101-128.
- Nagananda, G.S., Satishchandra, N. 2023. *In vitro* direct plant regeneration from somatic embryos developed from the leaf explants of *Flickingeria nodosa* (Dalz.) Seidenf. through synthetic seed technology. *South African Journal of Botany*, 153:77-82.
- Naing, A.H., Adedeji, O.S., Kim, C.K. 2021. Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement. *Scientia Horticulturae*, 283: 110043.
- Negrelle, R.R.B., Anacleto, A., Mitchell, D. 2012. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 34:.91-100.
- Neumann, K.H., Kumar, A., Imani, J. 2020. *Plant Cell and Tissue Culture—A Tool in Biotechnology Basics and Application*, 2nd ed.; Springer Nature Switzerland AG: Cham, Switzerland, pp. 1–11.
- Ördögh, M. 2022. Morphological, physiological features and differences of *Vriesea splendens* 'Fire' plants during *in vitro* multiplication and rooting. *International Journal of Horticultural Science*, 28.
- Paiva, P.D.O., Coelho Naves, V., Ferreira Dutra, L., Paiva, R., e Pasqual, M. 2009. *In vitro* propagation of *Nidularium fulgens*. *Interciencia*, 34:593-596.
- Pandey, D.K., Konjengbam, M., Ghorai, M., Dwivedi, P., Roy, D., Kant, N., Dey, A. 2022. Biotechnology for micropropagation and camptothecin production in *Ophiorrhiza* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106:3851-3877.

- Park, S. 2021. Plant Tissue Culture Techniques and Experiments, 5th ed.; Academic Press: Cambridge, M.A., USA; Elsevier Inc.: London, pp. 1–23.
- Paulo, M.L., Paula, C.C. 2018. Germination and morphology of the post-seminal development of *Aechmea bambusoides* (Bromeliaceae), a threatened species from the Brazilian flora. *Seed Science and Technology*, 46:225-231.
- Pe, P.P.W.; Naing, A.H.; Soe, M.T.; Kang, H.; Park, K.I.; Kim, C.K. 2020. Establishment of meristem culture for virus-free and genetically stable production of the endangered plant *Hosta capitata*. *Scientia Horticulturae*, 272:109591.
- Pedroso, A.N.V., Lazarini, R.A.D.M., Tamaki, V., Nievola, C.C. 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Brazilian Journal of Botany*, 33:407-414.
- Pereira, A.R., Pereira, T.S., Rodrigues, A.S. e Andrade, A.C.S. 2008. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Botanica Brasilica*, 22: 1150-1162.
- Pereira, B.R., de Aguiar, R.A., Pires, L.L. 2022. Consumo de Plantas Ornamentais e os Impactos Iniciais da Pandemia de Covid-19. *Biodiversidade Brasileira-BioBrasil*, 12:2.
- Pérez, F.J.; Lira, W. 2005. Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. *Journal of Plant Physiology*, Jena, 162:301-308.
- Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. 1984. Vegetative propagation of *Nidularium fulgens* Lem. *in vitro*. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 32:101-106.
- Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M., e Hendriks, J. 1984. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of *in vitro* cultivated seedlings of Bromeliaceae. *Scientia Horticulturae*, 24:193-199.
- Piza, I.M.T., Lima, G.P.P., Brasil, O.G. 2003. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. *Revista brasileira de Agrociência*, 9:361-366.
- Polidoros, A.N., Scandalios, J.G. 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione s-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*, Hoboken, 106:112-120.

- Pospíšil, P., 2009. Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787:1151–1160.
- Priyadarshini, S., Manokari, M., Shekhawat, M.S. 2020. Attenuation of morpho-anatomical disorders of micropropagated plantlets of *Crinum malabaricum* Lekhak and Yadav using seismo-mechanical stimulation. *Brazilian Journal of Botany*, 43:969-977.
- Pulido-Rueda, E.E., Milaneze-Gutierrez, M.A., Negrelle, R. 2018. *In vitro* germination and growth of *Vriesea incurvata* Gaudich.(Bromeliaceae). *Acta Agronómica*, 67:140-145.
- Rademacher W. 2015. Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *J Plant Growth Regul*, 34:845–872.
- Ramadan, R., Karas, M., Ranušová, P., Moravčíková, J. 2021. Effect of silver nitrate on *in vitro* regeneration and antioxidant responses of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.). *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 10:e4494-e4494.
- Ramage, C.M.; Williams, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. 2002. *In Vitro Cellular e Development Biology - Plant*, 38:1054-5476.
- Ramos, G.J.P., Bicudo, C.E.D.M., Moura, C.W.D.N. 2018. Diversity of green algae (Chlorophyta) from bromeliad phytotelmata in areas of rocky outcrops and " restinga", Bahia state, Brazil. *Rodriguésia*, 69:1973-1985.
- Rani, A., Donovan, N., Mantria, N. 2019. Review: The future of plant pathogen diagnostics in a nursery production system. *Biosens. Bioelectron*, 145:111631.
- Rehman, M., Fahad, S., Saleem, M.H., Hafeez, M., Rahman, M., Liu, F., Deng, G. 2020. Red light optimized physiological traits and enhanced the growth of ramie (*Boehmeria nivea* L.). *Photosynthetica*, 58:922-931.
- Resende, C.F., Pacheco, V.S., Dornellas, F.F., Oliveira, A.M.S., Freitas, J.C.E., Peixoto, P.H.P. 2018. Responses of antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and carbohydrates in micropropagated *Pitcairnia encholirioides* LB Sm.(Bromeliaceae) under ex vitro water deficit and after rehydration. *Brazilian Journal of Biology*, 79:53-62..
- Rocha, M.A.C., Costa, M.A.P.D.C., Silva, S.A., Ledo, C.A.D.S., Moreira, M.J.S., Bastos, L.P. 2008. *In vitro* rooting and acclimatation of genotypes of jenipapeiro (*Genipa americana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 769-774.

Rosa, W.S., Martins, J.P.R., Rodrigues, E.S., Rodrigues, L.C.A., Gontijo, A.B.P.L., Falqueto, A.R. 2018. Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the *in vitro* multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133:339-350.

Rosa, M. R., Brancalion, P. H., Crouzeilles, R., Tambosi, L. R., Piffer, P. R., Lenti, F. E., Metzger, J. P. 2021. Hidden destruction of older forests threatens Brazil's Atlantic Forest and challenges restoration programs. *Science advances*, 7:eabc4547.

Sakuta, M. 1987. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 71:459-463.

Sánchez, M.A., Coronado, Y.M., Coronado, A.C.M. 2020. Androgenic studies in the production of haploids and doubled haploids in *Capsicum* spp. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 73:9047–9056.

Santos, D.S., Tamaki, V., Nievola, C.C. 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 46:524-529.

Santos, E.R., Martins, J.P.R., Rodrigues, L.C.D.A., Gontijo, A.B.P.L., Falqueto, A.R. 2020. Morphophysiological responses of *Billbergia zebrina* Lindl.(Bromeliaceae) in function of types and concentrations of carbohydrates during conventional *in vitro* culture. *Ornamental Horticulture*, 26:18-34.

Sasamori, M.H., Endres Júnior, D., Droste, A. 2016. Baixas concentrações de macronutrientes beneficiam a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, Brasil. *Rodriguésia*, 67:1071-1081.

Sasamori, M.H., Endres Júnior, D., Droste, A. 2016. Baixas concentrações de macronutrientes beneficiam a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, Brasil. *Rodriguésia*, 67:1071-1081.

Schmidt, R., Schippers, J.H. 2015. ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850:1497-1508.



- Shahzad, A., Parveen, S., Sharma, S., Shaheen, A., Saeed, T., Yadav, V., Padhyay, A. 2017. Plant Tissue Culture: Applications in Plant Improvement and Conservation. In Plant Biotechnology: Principles and Applications (p. 37-72). Springer Singapore.
- Shulman, Y., Nir, G., Lavee, S. 1986. Oxidative processes in bud dormancy and the use of hydrogen cyanamide in breaking dormancy. *Acta Horticulturae*, 179:141-148.
- Sies H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4:80–3.
- Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, (ed.) *Oxidative stress*. London: Academic Press; 1985. p: 1–8.
- Silva, A. B. 2016. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 32:.619-626.
- Silva, A.L.L., Costa, J.D.L., Alcantara, G.B., Carvalho, D.C., Schuck, M.R., Biasi, L.A., Soccol, C.R. 2012. Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm.(Bromeliaceae). *Pak J Bot*, 44:1095-1101.
- Silva, E.C., Sibov, S.T., Santos, F.C.A.D., e Gonçalves, L.A. 2020. Influence of test tube sealing on the morpho-anatomy and ultrastructure of leaves of *Aechmea bromeliifolia* (Bromeliaceae) grown *in vitro*. *Rodriguésia*, 71.
- Silva, S.S.S., Souza, E.H., Souza, F.V.D., Nepomuceno, C.F., Carvalho Costa, M.A.P. 2020. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), an endemic and endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42:52940-e52940.
- Silva, T.C., Luiz, C., Oliveira, M.T., Borghezán, M., Pescador, R., Junior, P.C.P.F. 2022. Physiological responses of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. e Schult. f. (Bromeliaceae) *in vitro* cultured. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 10:016-025.
- Silva, Y.K., Moser, A.D.S., Ceneviva-Bastos, M., Affonso, A.L.S. 2021. Record of aquatic invertebrates associated with the bromeliads *Aechmea ornata* (Baker) and *Aechmea recurvata* (Klotzsch) LB Sm in two Atlantic Rainforest fragments of south Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 33:25.

- Skoog F., Miller C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *Vitro Symp Soc Exp Biol* 11:118-131
- Skoog F., Tsui C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. *Forestry* 45:197-210.
- Smith, L.B.; Downs, R.J. 1974. *Pitcairnoideae*. (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph* New York, 14:1-658.
- Soleimani, S.H., Bernard, F., Amini, M., Khavari-Nezhad, R.A. 2020. Cadmium accumulation and alkaloid production of *Narcissus tazetta* plants grown under *in vitro* condition with cadmium stress. *Plant Physiology*, 25:51–57.
- Talora, D.C.; Morellato, P. 2000. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 23:13-26.
- Tamaki, V.; Mercier, H.; Nievola, C. C. 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34:69-73. Resumo Expandido.
- Torres, A.C., Ferreira, A.T., SÀ, F.G., Buso, J.A., Caldas, L.S., Nascimento, A. S., Romano, E. 2000. Glossário de biotecnologia vegetal. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.
- Tsukagoshi H., Busch W., Benfey P.N. 2010. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 143:606-616.
- Viana, C.M.; Freire, D.; Abrantes, P.; Rocha, J.; Pereira, P. 2022. Agricultural land systems importance for supporting food security and sustainable development goals: A systematic review. *Science of the Total Environment*, 806:150718.
- Viana, F.A.P. 2007. Morfo-anatomia e desenvolvimento pós-seminal de cinco espécies de Bromeliaceae. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- Victório, C.P., Lage, C.L.S. 2009. Efeitos da qualidade de luz na germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *Phyllanthus tenellus*. *Revista Ciência Agronômica*, 40:400-405.
- Viehmanna, I., Cepkova, P.H., Vitamvas, J., Streblova, P., Kisilova, J. 2016. Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through adventitious

shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125:293-302.

Wanderley, M.D.G.L., Moreira, B.A. 2000. Notas taxonómicas sobre *Nidularium* Lem. e *Wittrockia* Lindm.(Bromelioideae, Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 14:1-9.

Wang, M., Ji, Y., Feng, S., Liu, C., Xiao, Z., Wang, X., Wang, Y., Xia, G. 2018. The non-random patterns of genetic variation induced by asymmetric somatic hybridization in wheat. *BMC Plant Biology*, 18:244.

Wang, S.Y., Faust, M., Jiao, H.J. 1991. Changes in superoxide dismutase activity during thidiazuron-induced lateral budbreak of apple. *HortScience*, 26:1202-1204.

Zeng J., Dong Z., Wu H., Tian Z., Zhao, Z. 2017. Redox regulation of plant stem cell fate. *EMBO Journal* , 36:2844-2855.

Zhang, S.G., Han, S.Y., Yang, W.H., Wei, H.L., Zhang, M., e Qi, L.W. 2010. Changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100:21.

Zolla, L., Rinalducci, S., 2002. Involvement of active oxygen species in degradation of light-harvesting proteins under light stresses. *Biochemistry* 41:14391-14402.

## CAPÍTULO I

Este capítulo refere-se ao primeiro objetivo que foi criar um protocolo de brotação *in vitro* da bromélia *Nidularium minutum*. Foi para publicação na revista *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 2023, ISSN 1807-863X.



## Differential sprouting ability during micropropagation of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)

Maria Gessi Teixeira<sup>1,2\*</sup> and Catarina Carvalho Nievola<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Rodovia Machado Paraguaçu, km 3, 37750-000 Machado, Minas Gerais, Brazil. <sup>2</sup>Núcleo de Conservação da Biodiversidade, Instituto de Pesquisas Ambientais, São Paulo, São Paulo, Brazil. \*Author for correspondence. E-mail: maria.teixeira@ifsuldeminas.edu.br

**ABSTRACT.** *Nidularium minutum* is an ornamental bromeliad from the Brazilian Rainforest. The micropropagation of this species is essential for obtaining plants available for conservation programs or commercial use. Our study aimed to establish an efficient plant production method by *in vitro* sprouting. This bromeliad takes a long time to sprout *in vitro*, and 10% of the plants produce shoots in a culture medium without plant growth regulators (PGRs). When subcultured in a PGR-free medium, these individualized shoots can sprout like the mother plant. The Murashige and Skoog basal medium (MS) containing 1.0 mg L<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine (BAP) promoted the induction of adventitious shoots in greater than 90% of the plants after 240 days of culture with an average of more than eight shoots per plant. Approximately 100% of the *in vitro*-produced shoots survived after acclimatization, reaching the flowering stage. Therefore, our results showed that *in vitro* regeneration of *N. minutum* depends on the cultivation period and that plants with a higher sprouting capacity can be selected and used as micropropagation matrices, contributing to the production of this endangered bromeliad.

**Keywords:** bromeliad; endangered species; ornamental plant; shooting; plant regeneration.

Received on August 19, 2022.  
Accepted on March 16, 2023.

### Introduction

*Nidularium minutum* Mez is a terricolous bromeliad endemic to the tropical rainforest, occurring exclusively in the State of São Paulo (Leme, 2000) and classified as vulnerable in the List of Endangered Species in Brazil (Brazil, 2022). Its ornamental features, such as the green and red primary bracts and the white flowers and fruits, make it a potential target for illegal extraction, which could further aggravate its endangered status. Furthermore, flowers and fruits are highly predated by wild animals, which may compromise the sexual propagation of this species.

Micropropagation is an efficient *ex-situ* conservation strategy for endangered species, which allows for keeping the species in a small space and obtaining high multiplication rates under controlled growth conditions (Engelmann, 2011). No studies on micropropagation of *N. minutum* by side sprouting are available in the literature, although this bromeliad has been cultivated *in vitro* for physiological and biochemical studies (Andrade & Tamaki, 2012; Andrade, Costa, Kurita, Carvalho, & Tamaki, 2012; Carvalho, Hayashi, Braga, & Nievola, 2013; Kurita, Machado, Teixeira, César, & Tamaki, 2014; Andrade & Tamaki, 2016).

Our preliminary results showed that *N. minutum* has low shoot production in medium without PGR and takes a long time to develop shoots even with PGRs added to the medium. Some studies have reported *in vitro* bud production by Bromeliaceae without exogenous inducers (Arrabal, Amancio, Carneiro, Neves, & Mansur, 2002; Santos, Tamaki, & Nievola, 2010), while others have shown that PGRs are essential for micropropagation (Hirimburegama & Wijesinghe, 1992; Mercier & Nievola, 2003; Mendes et al., 2007; Pasqual et al., 2008; Viehmannova, Cepkova, Vitamvas, Streblova, & Kisilova, 2016).

PGRs are involved in cell differentiation during new shoot formation (Faria et al., 2018) and are considered, in many cases, essential for micropropagation. Cytokinins and auxins, such as 6-benzylaminopurine (BAP) and 1-naphthylacetic acid (NAA), respectively, are the PGRs most widely used for producing Bromeliaceae sprouts *in vitro* (Silva et al., 2012; Faria et al., 2018; Dias, Silva, Carneiro, & Sousa, 2020).

Therefore, this study aimed to establish a micropropagation method for producing *N. minutum* plants.

## Material and methods

Seeds of *Nidularium minutum* Mez were harvested from fruits of plants growing in the “Alto da Serra de Paranapiacaba” Biological Reserve, São Paulo, São Paulo State, Brazil (23°46'18"-23°47'05" South Latitude and 46°20'24"-46°18'15" West Longitude). Harvesting was authorized by the *Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo* (IBt – 20.733/2005). The seeds were disinfected with 70% ethanol for 2 minutes and commercial bleach (2.5% active chlorine) plus Tween 20 (Labsynth, Brazil) for 15 minutes and rinsed three times with sterile distilled water. Afterward, the seeds were placed in a medium containing distilled water supplemented with sucrose (2%) and solidified with agar (0.6%) at pH 5.8 (Kurita et al., 2014). The seeds were maintained in a growth room at 25°C with a 12 hours (LED lamps) photoperiod for 30 days.

Thirty flasks with 10 seedlings germinated *in vitro* (as described above) were transferred to MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with sucrose (30 mg L<sup>-1</sup>), glycine (2 mg L<sup>-1</sup>), myo-Inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), nicotinic acid (0.5 mg L<sup>-1</sup>), pyridoxine-HCl (0.5 mg L<sup>-1</sup>), thiamine-HCl (0.1 mg L<sup>-1</sup>), solidified with 0.6% agar, at pH 5.8. The flasks were kept in a growth room at 25°C with a photoperiod of 16 hours (LED lamps, ~100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) for 240 days when the number of shoots per seedling was counted. Shoots were individualized and subcultured in a new basal MS medium without PGRs. Plants that did not produce shoots were also transferred to a new basal MS medium for a shorter time (45 days) to check their shooting ability.

To analyze the PGR efficiency in *N. minutum* shooting, seedlings were transferred to MS medium with sucrose (3%), glycine (2 mg L<sup>-1</sup>), myo-Inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), nicotinic acid (0.5 mg L<sup>-1</sup>), pyridoxine-HCl (0.5 mg L<sup>-1</sup>), thiamine-HCl (0.1 mg L<sup>-1</sup>), and agar (0.6%), at pH 5.8. Five treatments were performed: 0.1 mg L<sup>-1</sup> of NAA; 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP; 0.1 mg L<sup>-1</sup> of NAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP; 0.1 mg L<sup>-1</sup> of NAA + 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP; and control (PGR-free). The flasks were maintained in a growth room at 25°C with a 16 hours photoperiod (~100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). A randomized block design was carried out with four blocks of two flasks containing 10 plants per treatment (N = 80).

Every 30 days, the number of sprouted plants was checked without removing them from the culture flask. After 240 days of cultivation, the plants were removed from the flasks, the number of shoots per plant was counted, and biometric analyses were performed (aerial part length, root length, aerial part fresh and dry masses, root fresh and dry masses).

Plants were oven-dried at 65°C for seven days to determine the dry mass. The fresh and dry masses were determined using three plants per flask from each block (N = 12).

The data obtained were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA). Differences between means were evaluated with the Skott-Knot test at  $p < 0.05$ , using Sisvar version 5.7. Results were presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

Plant acclimatization was evaluated from 50 shoots isolated from five individuals of each treatment (10 shoots per plant). The shoots were transferred to trays with *Pinus* substrate (Maxfertil, Brazil). The same procedure was carried out with unsprouted plants. The trays were kept in a greenhouse and irrigated twice daily for seven minutes. After 60 days, the number of surviving shoots was counted.

## Results and discussion

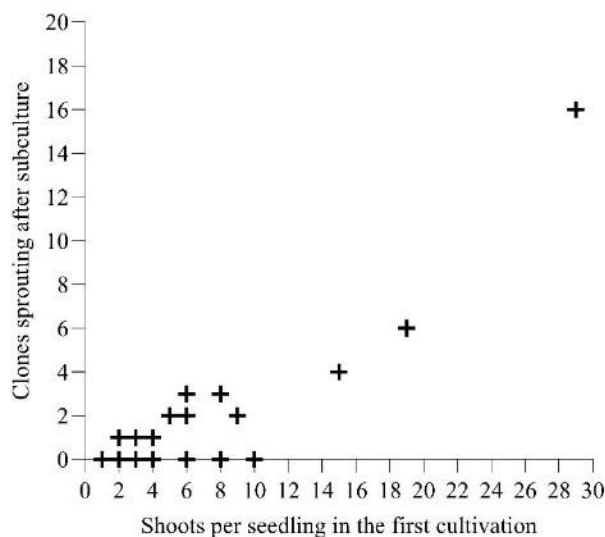
Only 10% of *N. minutum* seedlings grown in medium without PGRs produced shoots in 240 days. The number of shoots per seedling was not constant (Figure 1), indicating a differential sprouting capacity among individuals. Three seedlings had a high sprouting capacity, with 29, 19, and 15 shoots, respectively. However, only one-third of the seedlings sprouted above average (5.9 per plant), taking a long time to sprout (240 days). Some bromeliads grown *in vitro* in a medium without PGRs had higher percentages of shoot-producing plants than *N. minutum*. For example, *Bromelia balansae* had 25% after 249 days (Dias et al., 2020), and *Sincoraea mucugensis* had 77% after 60 days (Lima, Brito, & Santana, 2020).

The sprouting capacity also varied when *N. minutum* shoots (clones) were individualized and subcultured in a PGR-free medium for 45 days. The clones of the three individuals with the highest shoot potential produced 16, 6, and 4 shoots (Figure 1). Our results allowed us to select individuals with greater shooting capacity; however, identifying them took us a long time. We established a 45-day interval for subculturing because this or a similar period has been described in protocols for obtaining bromeliads by lateral sprouting (Martínez et al., 2013; Viehmannova et al., 2016; Rosa et al., 2018).

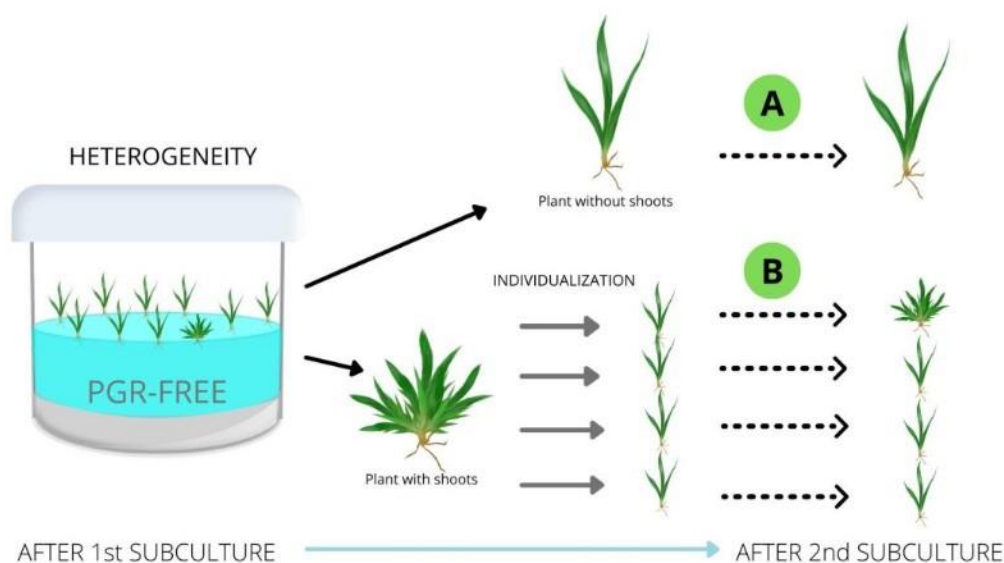
The method summarized in figure 2 shows the differential multiplication capacity of *N. minutum* individuals. Seedlings of unsprouted plants did not produce new sprouts after subculturing (A). When shoots



(clones) of sprouted seedlings were individualized and subcultured in a PGR-free medium, approximately one-quarter of the clones sprouted in 45 days (B), indicating that sprouted clones can produce shoots like the mother plant. The *in vitro* shooting capacity of *N. minutum* might be related to genes that control the levels of hormones involved in bud branching, as reported by Tantikanjana et al. (2001) for *Arabidopsis*. Furthermore, according to Leyser (2009), specific genes control the increase in the number and sprouting of the initial buds.



**Figure 1.** Variation of sprouting capacity in *Nidularium minutum* seedlings during the first 240 days of culture and sprouted clones after subculturing them for 45 days in a PGR-free medium. Each + represents a seedling of the 30 observed (some + overlap, not being visible on the graph).

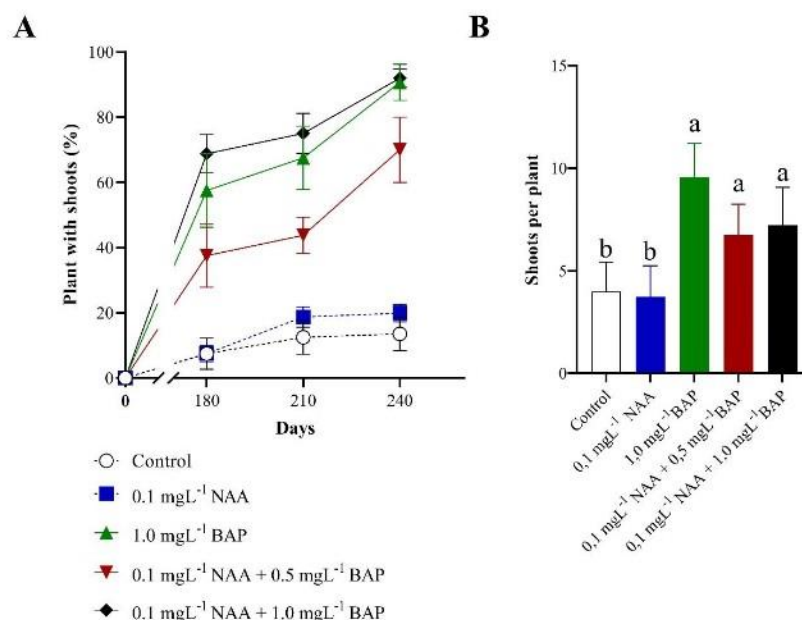


**Figure 2.** Differential multiplication capacity of *Nidularium minutum* individuals grown in a PGR-free medium.

Regarding the efficiency of PGRs in *N. minutum* sprouting, our results showed that even with the addition of PGRs to the culture medium, a long period is needed to reach a high sprout production rate. The addition of BAP, alone or with NAA, promoted more than 90% of sprouted plants in 240 days. Approximately 10% of the plants produced shoots in the treatment with only  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA (Figure 3 A). The average number of shoots per plant in the medium containing only auxin did not differ from the PGR-free medium. The treatments with BAP promoted the highest average number of shoots per plant at 240 days (Figure 3B).

Some studies have reported that the synergistic effect between BAP and NAA increased the *in vitro* shoot production of different bromeliad species, such as *Aechmea blanchetiana* and *A. distichantha* (Santa-Rosa, Souza, Vidal, & Ledo, 2015). However, treatments combining NAA and BAP did not increase shoot production in *N. minutum* compared to those with only BAP. This result might be related to cytokinin action, which

decreased apical dominance and induced shoot formation (Pierik, 1997). Mercier, Souza, Kraus, Hamasaki, and Sotta (2003) observed increased shoot formation in *Ananas comosus* leaves cultivated in a medium with BAP and NAA when the apical dominance was broken. These authors suggested that the BAP and NAA joint presence increases the endogenous iP cytokinin content, indicating that iP production is regulated in response to the uptake of these PGRs. In our study, the auxin production by the apical bud was not interrupted since we used the entire *N. minutum* plantlet. Furthermore, using NAA and BAP in the culture medium was not more efficient than BAP alone, indicating that adding auxin does not favor *N. minutum* multiplication, unlike what has been reported for other bromeliad species (Silva et al., 2012).



**Figure 3.** Shooting in *Nidularium minutum* grown in a culture medium with the addition of 6-benzylaminopurine (BAP) and/or 1-naphthylacetic acid (NAA). Control medium = PGR-free. (A) Percentage of *Nidularium minutum* plants with shoots grown for 240 days; (B) Number of shoots per *N. minutum* plant after 240 days of cultivation. Means followed by the same letters do not differ significantly according to the Scott-Knott test ( $p \geq 0.05$ ).

BAP is the most used cytokinin for *in vitro* propagation due to its remarkable ability to act in the aerial part, producing more shoots than other PGRs (Coelho, Gonçalves, González-Benito, & Romano, 2012; Bekircan, Yaşar, Yıldırım, Sökmen, & Sökmen, 2018; Komakech et al., 2020; Kornatskiy, 2020). In a medium with 5  $\mu\text{M}$  BAP ( $\sim 1.13 \text{ mg L}^{-1}$ ), the bromeliad *Aechmea blanchetiana* showed 100% sprouted plants after 60 days (Rosa et al., 2018). *Puya berteroniana* cultivated *in vitro* in a medium with 0.44  $\mu\text{M}$  BAP ( $\sim 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) for 28 days had an average of 5.5 shoots per plant (Viehmanna et al., 2016). In this study, using BAP significantly increased shoot production in *N. minutum*. However, *N. minutum* needed a more extended period (240 days) than *Nidularium procerum* and *Nidularium innocentii* to obtain more than 90% sprouting. According to Silva et al. (2012), these other *Nidularium* species require 120 days to reach 100% and 61% shoot production, respectively, using 4  $\mu\text{M}$  ( $\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$ ) of BAP and 2  $\mu\text{M}$  of NAA ( $0.37 \text{ mg L}^{-1}$ ). We required PGR concentrations close to those mentioned in previous studies to induce shoot production in *N. minutum*. We preliminary tested higher BAP concentrations (2 and 2.5  $\text{mg L}^{-1}$ ) but shoot formation did not increase.

Cytokinin added to the medium inhibited the elongation of aerial parts and roots. As shown in Table 1, control plants, or those only with NAA in the medium, had larger aerial parts and roots. Nonetheless, the biomass accumulation in *N. minutum* did not differ significantly between PGR treatments. These results could be associated with cytokinins' positive and negative regulatory roles in cell proliferation, stimulating mitosis in some tissues or differentiation in others (Schaller, Street, & Kieber, 2014). Previous studies have also revealed that there is most likely some resource partition between the mother plant and the new clones in the shoots, possibly due to BAP-mediated coordination of shoot production, which involves nutrient availability signaling (Schmülling, 2002; Tamaki & Mercier, 2007).

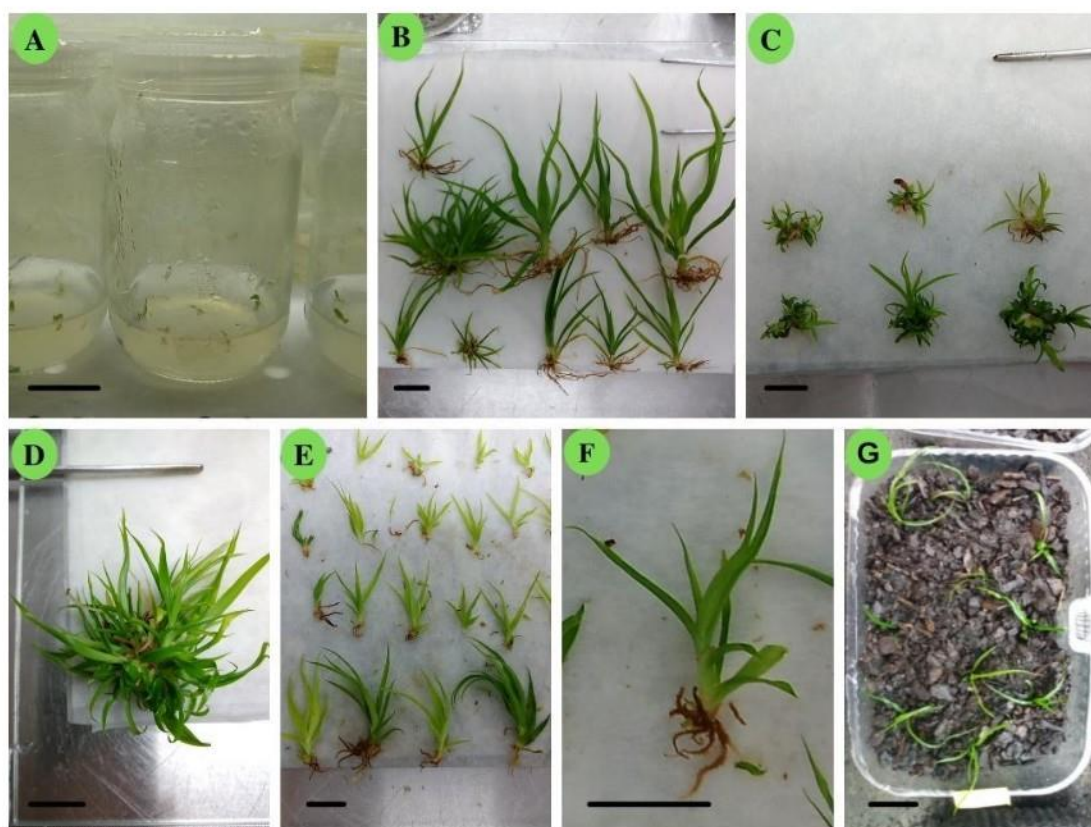
Figure 4 illustrates the steps in *N. minutum* *in vitro* propagation from plantlets (A. Seedling; B-C. Growth and shoot induction; D. Individual shoot production; E-F. Individualization of shoots from the mother plant; and G. Acclimatization).



**Table 1.** Biometric parameters of *Nidularium minutum* after 240 days of growth in MS medium with and without the addition of 6-Benzylaminopurine (BAP) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA)\*.

PGR (mg L <sup>-1</sup> )		Length (cm)				Mass (g)							
NAA	BAP	Aerial Part		Root		Fresh				Dry			
		Aerial Part	Root	Aerial Part	Root	Aerial Part	Root	Aerial Part	Root	Aerial Part	Root		
0	0	6.39	±0.59a	3.01	±0.37a	0.56	±0.08a	0.09	±0.02a	0.04	±0.01a	0.01	±0.004a
0.1	0	7.15	±0.38a	3.33	±0.49a	0.63	±0.07a	0.15	±0.01a	0.06	±0.01a	0.02	±0.003a
0	1.0	2.40	±0.21b	0.46	±0.22b	0.49	±0.13a	0.06	±0.01a	0.05	±0.01a	0.01	±0.002a
0.1	0.5	3.10	±0.53b	0.98	±0.44b	0.38	±0.13a	0.08	±0.03a	0.04	±0.01a	0.01	±0.003a
0.1	1.0	2.13	±0.43b	0.50	±0.15b	0.34	±0.06a	0.11	±0.04a	0.06	±0.02a	0.02	±0.008a

(\*) Different letters between columns indicate that the means differ significantly by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ )



**Figure 4.** Steps in *Nidularium minutum* propagation. (A) Seedlings approximately 30 days after germination. (B) Plants obtained from the PGR-free medium after 240 days. (C) Treatment plants with 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP after 240 days. (D) Detail of the shoot proliferation from one seedling. (E) Shoots separated from the mother plant (the mother plant is no longer recognized). (F) Detail of the individualized shoot with roots. (G) Plants with 60 days of acclimatization. (Bars = 2 cm.)

This study showed a method to identify individuals with different shoot production capacities for the first time. Likewise, it evaluated the plant production capacity for micropropagation of *N. minutum* by lateral buds, including acclimatization. Sixty days after acclimatization, the plants showed 100% survival. Individual shoots and unsprouted seedlings were successfully acclimatized. Other bromeliad species have also demonstrated a high percentage of survival after acclimatization (Santa-Rosa et al., 2013; Faria et al., 2018; Lima et al., 2020; Silva, Souza, Souza, Nepomucen, & Costa, 2020).

## Conclusion

For the first time, the differential sprouting ability of *N. minutum* plants *in vitro* was demonstrated. Some individuals showed a higher sprouting capacity, even in a PGR-free medium. The clones of these individuals also tended to sprout, which could aid the micropropagation of this species and support genetic improvement studies. Additionally, a high micropropagation performance is achieved using only BAP, despite the long period required to respond to PGR stimuli. The differential sprouting capacity during micropropagation can be used as a production strategy for repopulation programs and/or commercial purposes, reducing the impact of extractivism of this endemic and endangered bromeliad.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Adriana de Oliveira Fidalgo and Dr. Helenice Mercier for contributing to this manuscript. We also thank Dr. J. R. Lima for reviewing the English version of this manuscript. We would also like to thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for the final revision of the text of the manuscript (AUXPE: 528/2021).

## References

- Andrade, S. V., Costa, C., Kurita, F., Carvalho, C. P., & Tamaki, V. (2012). *In vitro* growth of *Nidularium minutum* and *Ananas ananassoides* with changes in the amount of culture media for flash. *Communications in Plant Sciences*, 2(3-4), 67-69.
- Andrade, S. V., & Tamaki, V. (2012). Influence of NPK on the growth of bromeliad *Nidularium minutum* Mez. cultivated *in vitro*. *Communications in Plant Sciences*, 2(3-4), 137-139. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1161775>
- Andrade, S. V., & Tamaki, V. (2016) *In vitro* growth of *Nidularium minutum* mez (Bromeliaceae) in different concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium. *Journal of Plant Nutrition*, 39(11), 1634-1643. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1161775>
- Arrabal, R., Amancio, F., Carneiro, L. A., Neves, L. J., & Mansur, E. (2002). Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (LB Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation*, 11(6), 1081-1089. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1015860804695>
- Bekircan, T., Yaşar, A., Yıldırı, S., Sökmen, M., & Sökmen, A. (2018). Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. shoots. 3 *Biotech*, 8(3), 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1206-2>
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente, Gabinete do Ministro. (2022). Portaria nº 148, de 7 de junho. *Diário Oficial da União*. Retrieved on July 10, 2022 from <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>
- Carvalho, C. P., Hayashi, A. H., Braga, M. R., & Nievola, C. C. (2015). Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 71, 144-154. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.005>
- Coelho, N., Gonçalves, S., González-Benito, M. E., & Romano, A. (2012). Establishment of an *in vitro* propagation protocol for *Thymus lotocephalus*, a rare aromatic species of the Algarve (Portugal). *Plant Growth Regulation*, 66(1), 69-74. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9630-x>
- Dias, G. J. S., Silva, L. F., Carneiro, L. A., & Sousa, C. M. (2020). *In vitro* multiplication of bromeliads *Aechmea aquilega* and *Bromelia balansae*. *Brazilian Journal of Development*, 6(4), 17464-17476. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-062>
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 47(1), 5-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>
- Faria, D. V., Simão, M. J., Cipriano, R., Werner, E. T., Soares, T. C. B., Aoyama, E. M., & Lima-Gontijo, A. B. P. (2018). *In vitro* morphogenesis and micropropagation of *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. (Bromeliaceae) from leaf explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 54(5), 530-536. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9907-0>
- Hirimburegama, K., & Wijesinghe, L. P. J. (1992). *In vitro* growth of *Ananas comosus* L. Merr (pineapple) shoot apices on different media. *Acta Horticulturae*, 319(29), 203-208. DOI: <https://doi.org/10.17660/actahortic.1992.319.29>
- Komakech, R., Kim, Y. G., Kim, W.J., Omujal, F., Yang S., Moon, B. C., ... Kang, Y. (2020). A micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (Hook f.) Kalkman: Genetic fidelity and physiological parameter assessment. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1-14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.548003>
- Kornatskiy, S. A. (2020). Pineapple micropropagation (*Ananas comosu* sl. smooth cayenne) and plant growth features in the process of adaptation in hydroponics. *Journal of Critical Reviews*, 7(8), 3227-3234. DOI: <https://doi.org/10.31838/jcr.07.08.518>



- Kurita, F. M. K., Machado, B. M., Teixeira, N. B., César, C. G. A., & Tamaki, V. (2014). Phenology, *in vitro* cultivation, and acclimatization of the endangered bromeliad species *Nidularium minutum* Mez. *Biotemas*, 27(1), 59-69. DOI: <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2014v27n1p59>
- Leme, E. M. C. (2000). *Nidularium - bromélias da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro, RJ: Sextante.
- Leyser, O. (2009). The control of shoot branching: an example of plant information processing. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 694-703. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01930.x>
- Lima, A. P. P. S., Brito, A., & Santana, J. R. F. D. (2020). Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. *Ciência Rural*, 50(2), 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180922>
- Mendes, G. C., Soares, C. Q. G., Braga, V. F., Pinto, L. C., Santana, R., & Viccini L. F. (2007). Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) Mez (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S2), 972-974
- Mercier, H., & Nievola, C. C. (2003). Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia*, 1(1), 57-62.
- Mercier, H., Souza, B. M., Kraus, J. E., Hamasaki, R. M., & Sotta, B. (2003). Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15(2), 107-112. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202003000200006>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pasqual, M., Santos, F. C., Figueiredo, M. A., Junqueira, K. P., Rezende, J. C., & Ferreira, E. A. (2008). Protocol for *in vitro* micropropagation of ornamental pineapple. *Horticultura Brasileira*, 26(1), 45-49. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362008000100009>
- Martínez, A. P., Lauda, T., Mora, M., Carvajal, C., Aragón, C., González, J., ... Feijoo, J. C. L. (2013). Micropropagation of *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. for sustainable production of plant proteases. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(8), 2525-2537. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1288-8>
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Berlin, GE: Springer. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5750-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5750-6_2)
- Rosa, W. S., Martins, J. P. R., Rodrigues, E. S., Rodrigues, L. C. A., Gontijo, A. B. P. L., & Falqueto, A. R. (2018). Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the *in vitro* multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133(3), 339-350. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1385-x>
- Santa-Rosa, S., Souza, F. V., Vidal, Á. M., Ledo, C. A. D. S., & Santana, J. R. (2013). Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. *Horticultura Brasileira*, 31(1), 112-118. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000100018>
- Santos, D. S., Tamaki, V., & Nievola, C. C. (2010). *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(6), 524-529. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9325-4>
- Schaller, G. E., Street, I. H., & Kieber, J. J. (2014). Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 7-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.015>
- Schmülling, T. (2002). New insights into the functions of cytokinins in plant development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(1), 40-49. DOI: <https://doi.org/10.1007/s005440010046>
- Silva, A. L. L., Costa, J. D. L., Alcantara, G. B., Carvalho, D. C., Schuck, M. R., Biasi, L. A., ... Soccol, C. R. (2012). Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 44(3), 1095-1101.
- Silva, S. S. S., Souza, E. H., Souza, F. V. D., Nepomuceno, C. F., & Costa, M. A. P. C. (2020). Micropropagation and *in vitro* conservation of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), an endemic and endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42(1), 1-10. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.52940>
- Tamaki, V., & Mercier, H. (2007). Cytokinins and auxin communicate nitrogen availability as long-distance signal molecules in pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Plant Physiology*, 164(11), 1543-1547. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.010>

- Tantikanjana, T., Yong, J. W., Letham, D. S., Griffith, M., Hussain, M., Ljung, K., ... Sundaresan, V. (2001). Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPERSHOOT gene. *Genes & Development*, *15*, 1577-1588. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.887301>
- Viehmánová, I., Cepková, P. H., Vitamvas, J., Streblova, P., & Kisilova, J. (2016). Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through adventitious shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *25*(2), 293-302. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0949-x>

## CAPÍTULO II

Este capítulo refere-se aos estudos das atividades enzimáticas e alterações anatômicas durante a brotação *in vitro* da *N. minutum*.

Pretende-se submeter o artigo para o periódico “Plant Cell, Tissue and Organ Culture”.

## **Dinâmica da atividade de enzimas antioxidantes e alterações anatômicas durante a brotação in vitro de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae)**

Maria Gessi Teixeira<sup>1,2</sup>, Adriana Hissae Hayashi<sup>3</sup>, Catarina Carvalho Nievola<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Laboratório de Biotecnologia, Rodovia Machado - Paraguaçu, km 3 - Bairro Santo Antônio, 37750-000 - Machado, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto de Pesquisas Ambientais, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Av. Miguel Estéfano, 3687, Água Funda, 04301-902 - São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisas Ambientais, Núcleo de Conservação da Biodiversidade, Av. Miguel Estéfano, 3687, Água Funda, 04301-902 - São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author: Maria Gessi Teixeira - maria.teixeira@ifsuldeminas.edu.br

### **RESUMO**

Vários fatores determinam a diferenciação celular e, conseqüentemente, a formação de brotos em plantas micropropagadas, entre eles, a presença das espécies reativas de oxigênio (ROS), que são moduladas pelo sistema antioxidante. Este trabalho teve objetivo de investigar a atividade do sistema antioxidante durante a brotação in vitro de *N. minutum*, assim como identificar as alterações anatômicas decorrentes do desenvolvimento das gemas. Plântulas de *N. minutum* provenientes da germinação in vitro foram cultivadas em meio com e sem 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP). Análises da brotação, peroxidação lipídica (LPO) e atividade das enzimas antioxidantes foram realizadas em plantas que brotaram e comparadas às que não brotaram. As avaliações anatômicas revelaram que a formação das gemas ocorreu de forma assincrônica, sendo um processo contínuo e intensificado pela presença de BAP. Na base do caule destas plantas houve o intumescimento devido à divisão das células parenquimáticas subepidérmicas que originaram as gemas adventícias por organogênese direta. Observou-se que os níveis de LPO foram maiores nas plantas cultivadas em meio com BAP e que não apresentavam brotos (90 dias de cultivo), diminuindo após 240 dias. A transição do desenvolvimento de gemas para brotos foi acompanhada por diferenças nas atividades, principalmente, da superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR), indicando que ocorre um ajuste dinâmico nas reações de oxirredução entre essas enzimas durante o processo da organogênese dos brotos.

**Palavras-chave:** Anatomia caulinar, Bromélia, Espécies Reativas de Oxigênio, Gemas adventícias, Micropropagação, Organogênese.

## ABSTRACT

Several factors determine cell differentiation and, consequently, the formation of shoots in micropropagated plants, including the presence of reactive oxygen species (ROS), which are modulated by the antioxidant system. This work aimed to investigate the activity of the antioxidant system during the *in vitro* sprouting of *N. minutum*, as well as to identify the anatomical alterations resulting from the development of the buds. *N. minutum* seedlings from *in vitro* germination were cultivated in medium with and without 1 mg L<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine (BAP). Analysis of shoot formation, lipid peroxidation (LPO) and activity of antioxidant enzymes was carried out in plants with and without shoots. Anatomical analyses revealed that shoot formation occurred asynchronously, being a continuous process intensified by the presence of BAP. At the stem base of the plants there was swelling due to the division of the subepidermal parenchyma cells that originated the adventitious buds by direct organogenesis. LPO levels were higher in plants grown in medium with BAP and without shoots (90 days of cultivation) compared with plants with shoots and control plants, decreasing after 240 days. The transition from bud to shoot development was accompanied by differences in the superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) activities, indicating that there is an adjustment in redox reactions between these enzymes and the ROS involved in the process of bud development and shoot organogenesis in *N. minutum*.

Anatomia caulinar, Bromélia, Espécies Reativas de Oxigênio, Micropropagação, Organogênese.

**Keywords:** Adventitious buds, Bromeliad, Micropropagation, Organogenesis, Reactive Oxygen Species, Stem anatomy.

## INTRODUÇÃO

O princípio básico da cultura de tecidos vegetais é a totipotência, ou seja, a capacidade de algumas células vegetais se regenerarem até formarem uma planta inteira (Bhojwani e Razdan 1996). A totipotência é induzida sob condições apropriadas, como luz, nutrientes e temperatura (Fehér 2019), dentre outros fatores. Essa capacidade morfogênica das células e tecidos vegetais resulta na formação de órgãos, brotos ou plantas inteiras, permitindo inúmeras

aplicações da biologia vegetal *in vitro* em estudos de botânica básica, bioquímica, propagação, melhoramento e desenvolvimento de transgênicos (Bijalwan 2021).

A organogênese que ocorre durante a indução da brotação *in vitro* depende de vários fatores bióticos e abióticos, endógenos e exógenos, que podem interferir na qualidade e quantidade dos brotos. Além dos micronutrientes e macronutrientes presentes no meio de cultura, muitas vezes são utilizados reguladores de crescimento de planta (PGR) para diferentes finalidades como alongamento celular, rizogênese e brotação (Rademacher 2015), influenciando quase todos os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas (Hwang e Sheen 2001). A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é a mais utilizada na propagação *in vitro* devido à sua grande capacidade de atuar na parte aérea, induzindo a produção de muitos brotos em comparação com outros PGRs (Coelho et al. 2012; Bekircan et al. 2018; Komakech et al. 2020; Kornatskiy 2020).

Há estudos que indicam o papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) nos processos de proliferação e diferenciação celular (Hassan e Fridovich 1977; Liskay et al. 2004; Fujita et al. 2006; Dunand et al. 2007; Tsukagoshi et al. 2010; Zeng et al. 2017). As ROS regulam a proliferação celular e as funções biológicas, sendo benéficas em baixos níveis e essenciais para a manutenção da vida (Mittler 2017).

Algumas ROS podem provocar a peroxidação da membrana lipídica (LPO) (Triantaphylides et al. 2008). Por muito tempo, a LPO foi considerada o principal mecanismo molecular envolvido na deterioração oxidativa da arquitetura celular, eventualmente, causar danos ou até mesmo levar à morte da célula (Bhattacharjee 2005; Skorzynska-Polit 2007; Farooqui e Farooqui 2011). Porém, estudos mostram que a peroxidação da membrana nem sempre é prejudicial à célula e está envolvida na regulação do ciclo celular (Girrotti 1998; Farmer e Mueller 2013).

A manutenção basal das ROS pode ser regulada por meio da ativação do sistema antioxidante, composto por enzimas ou outras moléculas que podem desativar as ROS a fim de não provocarem danos celulares (Fujita et al. 2006; Zeng et al. 2017). A atividade das enzimas antioxidantes muitas vezes está relacionada com a capacidade dos tecidos de plantas se diferenciarem. Estudos apontam que atividades de enzimas antioxidantes estão envolvidas na regeneração de calos de milho (Racchi e Terragna 1993), de *Acanthophyllum sordidum* (Meratan et al. 2009) e de *Brassica rapa* (Abbasi et al. 2010). A relação da atividade de enzimas antioxidantes com a brotação *in vitro* já foi relatada em *Gladiolus hybridus* (Dutta Gupta e Datta 2003), em *Albizia odoratissima* (Rajeswari e Paliwal 2008), em *Cardiospermum halicacabum* (Jahan et al. 2014) e em *Curculigo orchioides* (Dutta Gupta e Sahoo 2015). Fernández-García et al. (2004) sugerem que o aumento das atividades de peroxidase (POX) e catalase (CAT)



implicam no desenvolvimento do sistema vascular em enxerto de tomate. Pinto e Gara (2004) reportaram que a presença de ascorbato peroxidase (APX) na parede celular desempenha um papel crítico na regulação do processo de enrijecimento da parede durante a diferenciação celular. Mitrović et al. (2012) sugerem que a atividade das enzimas CAT, POX e superóxido dismutase (SOD) seja crucial durante a organogênese direta do caule de *Tacitus bellus*. Estudos anatômicos também podem auxiliar no entendimento dos mecanismos da brotação e a relação com a atividade das enzimas antioxidantes (Rajeswari e Paliwal 2008; Mitrović et al. 2012; Souza et al. 2021).

A brotação in vitro é muito utilizada para propagação de bromélias ornamentais ameaçadas de extinção (Pierik e Steegmans 1984; Paiva et al. 2009; Silva et al. 2012; Ördögh 2015; Flores et al. 2018; Lima et al. 2020; Silva et al. 2020). A bromélia *Nidularium minutum* é terrícola, endêmica do Estado de São Paulo e ocorre na Floresta Atlântica (Leme 2009). Apresenta potencial ornamental (Carvalho et al. 2013) e é considerada como "vulnerável" (Brazil, 2022) devido ao extrativismo ilegal e à diminuição da área de Mata Atlântica (Zizka et al. 2020). Estudos em nosso laboratório mostraram que a brotação in vitro desta bromélia não é uniforme, mesmo quando induzida por PGRs (Teixeira & Nievola 2023), indicando heterogeneidade nas plantas cultivadas nas mesmas condições in vitro.

A hipótese deste trabalho foi que o potencial de brotação da bromélia *N. minutum* é regulado por alterações de eventos oxidativos devido à perturbação no nível de estado estacionário das ROS, resultante da presença ou não de indutor de brotação no meio de cultura.

Este trabalho teve por objetivo avaliar as alterações do sistema antioxidante e respostas oxidativas e associá-las às alterações anatômicas que ocorrem durante a formação dos brotos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção de material vegetal**

Sementes de *Nidularium minutum* Mez foram colhidas de plantas da Reserva Biológica Alto da Serra de Paranapiacaba, São Paulo, SP, Brasil (23°46'18"-23°47'05" S e 46°20'24"-46°18'15" O) e desinfestadas com etanol 70% por 2 minutos e em alvejante comercial (cloro ativo 2,5%) mais Tween 20 por 15 minutos. As sementes foram lavadas três vezes com água destilada estéril e colocadas em meio para germinação, constituído por água destilada suplementada com sacarose (2%) e solidificada com ágar (0,6%), pH 5,8 (Kurita et al. 2014). Os frascos com as sementes foram mantidos em sala de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 16 horas ( $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 40 dias.

Após este período, as plântulas foram transferidas para frascos contendo meio MS suplementado com sacarose ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ), glicina ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), piridoxina-HCl ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiamina-HCl ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ágar 0,6%, pH 5,8, com BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) para indução da brotação. Como controle, foi usado o mesmo meio de cultivo, porém sem o BAP. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a  $25^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 h ( $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). O experimento foi constituído por 30 frascos por tratamento com 10 plântulas em cada frasco.

### **Caracterização da brotação**

As avaliações da porcentagem de plantas com brotos foram feitas aos 90, 120, 210 e 240 dias de cultivo em meio MS com e sem BAP.

A determinação do número de brotos por planta foi feita somente aos 240 dias de cultivo em meio MS com e sem BAP.

### **Biometria**

Aos 240 dias de cultivo em meio MS com e sem BAP, as plantas foram avaliadas quanto ao comprimento e quanto à biomassa (massa fresca e massa seca) da parte aérea. Para análise da massa fresca (FM), a parte aérea das plantas foi separada das raízes e pesada em balança analítica de precisão. O material foi armazenado em sacos de papel e colocados em estufa de secagem a  $60^\circ\text{C}$  por 72 horas. Após este período, o material foi pesado para obtenção da massa seca da parte aérea (DM) de acordo com protocolo descrito por Couto et al. (2014).

### **Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes e quantificação de LPO**

As análises das atividades das enzimas foram realizadas em plantas cultivadas por 40 dias em meio de germinação (tempo inicial) e aos 90 e 240 dias de cultivo em meio MS. Aos 90 dias as plantas cultivadas em meio com BAP foram divididas em dois grupos: com brotos e sem brotos.

As análises enzimáticas foram realizadas conforme protocolo de padronização estabelecido para *Nidularium minutum* por Nievola (2017).

### ***Preparo do extrato enzimático***

Partes aéreas das plantas (0,2 g por amostra) foram maceradas e homogeneizadas em meio de extração composto por tampão fosfato de potássio 1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 50 mM e ácido ascórbico 1 mM. As amostras foram centrifugadas em 11000 g a 4 °C por 15 min. O sobrenadante (extrato enzimático) foi utilizado para a análise das atividades das enzimas descritas a seguir.

### ***Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes***

A atividade da enzima CAT foi determinada de acordo com o protocolo de Luck (1965). A atividade da CAT foi definida pelo acompanhamento do consumo de peróxido de hidrogênio (coeficiente de extinção 0,04 mM cm<sup>-1</sup>) a 240 nm por 2 min. A solução de reação foi composta por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e peróxido de hidrogênio 10 mM, adicionada a 100 µL do extrato enzimático.

A atividade da enzima APX foi determinada de acordo com o protocolo de Nakano e Asada (1981), modificado por Weng *et al.* (2007). A atividade da APX foi definida pela medida do decréscimo da absorvância a 290 nm (coeficiente de extinção de 2,8 mM cm<sup>-1</sup>) por 2 min. A solução de reação foi composta por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio 0,2 mM, adicionada a 50 µL do extrato enzimático.

A atividade da enzima glutathione redutase (GR) foi determinada de acordo com protocolo de Schaedle e Bassham (1977). A atividade da GR foi definida pelo decréscimo da absorvância em 340 nm (coeficiente de extinção de 6,2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) por 2 min devido à oxidação de NADPH, de acordo com o método. A solução de reação foi composta por tampão Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, NADPH 0,15 mM, GSSG 0,5 mM e MgCl<sub>2</sub> 3 mM adicionada a 100 µL do extrato enzimático.

A atividade da enzima SOD foi determinada de acordo com o protocolo de Beauchamp e Fridovich (1971), modificado por Balen *et al.* (2009). A atividade da SOD foi analisada pela medida da inibição da redução fotoquímica do azul nitro tetrazólio (NBT). A solução de reação foi composta por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), riboflavina 2 µM, metionina 10 mM, NBT 56 µM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM, adicionada a 50 µL do extrato enzimático. Este sistema foi colocado em uma caixa de luz por 10 minutos. Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima bruta requerida para causar 50% de inibição da taxa de redução da NBT a 560 nm.

### ***Estimativa do nível da peroxidação lipídica***

O nível de peroxidação lipídica foi determinado pelo conteúdo de hidroperóxido com duplas ligações conjugadas (HPDC). Para extração de HPDC 0,02 g da parte aérea das plantas foram homogeneizados em etanol 96% (v/v). A absorção foi medida no sobrenadante a 234 nm e sua concentração foi calculada por meio de  $\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Levin e Pignata 1995). Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol g}^{-1}$  por massa fresca.

### **Análises anatômicas**

As análises anatômicas para a observação de gemas e brotos em desenvolvimento foram efetuadas em plantas no tempo inicial do experimento e naquelas cultivadas por 90 dias em meio MS com e sem BAP. As plantas foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) e, em seguida, o material foi levado a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. As folhas e raízes foram parcialmente retiradas para a inclusão principalmente do caule. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em resina histológica (Leica Historesin). O material incluído foi seccionado transversal e longitudinalmente na espessura de 7  $\mu\text{m}$  em micrótomo rotatório (Leica RM2245) com navalha de aço descartável. O material seccionado foi corado com azul de toluidina 0,05% (Sakai 1973) em tampão fosfato e citrato (McIlvaine 1921) pH 4,5. A presença dos grãos de amido foi evidenciada pelo lugol (Berlyn e Miksche 1976). As lâminas permanentes foram montadas com resina Entellan. O material foi fotografado ao microscópio óptico Olympus BX41 com câmera Olympus SC100 usando o programa Olympus cellSens Standard v.3.2.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização da Brotação e Biometria**

Aos 90 dias, a brotação de *N. minutum* foi maior na presença de BAP, atingindo 50% de plantas com brotos, enquanto somente 10% das plantas do controle apresentaram brotação. Aos 240 dias, 100% das plantas cultivadas em meio com BAP brotaram com 8,4 brotos por planta, enquanto apenas 20% das plantas do controle apresentaram brotação, com 2,7 brotos por planta (Fig. 1A, B).

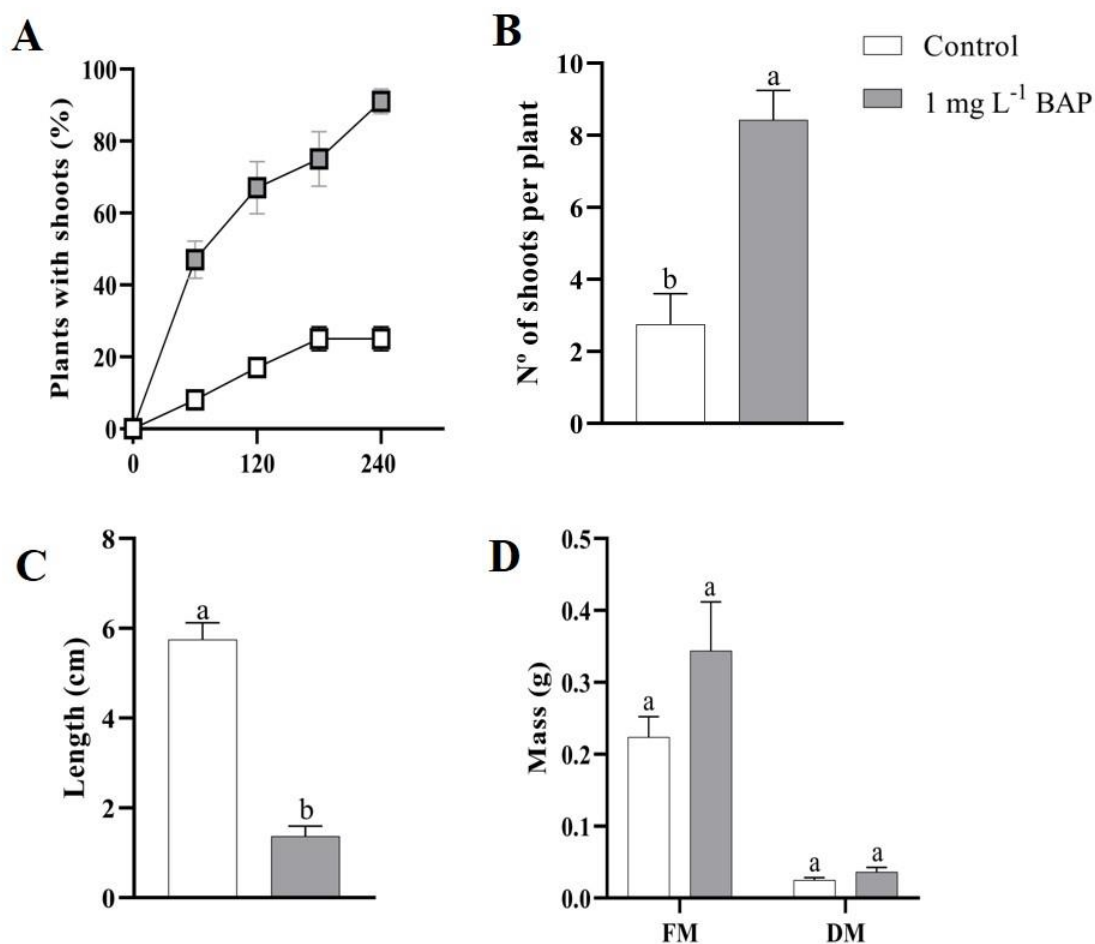


Figura 1: Caracterização da brotação e biometria de *Nidularium minutum* cultivadas em meio MS com adição de 6-benzilaminopurina (BAP); Meio de controle não possui BAP. A - Porcentagem de plantas com brotos durante 240 dias de cultivo. B - Número de brotos por planta aos 240 dias. C - Comprimento da parte aérea aos 240 dias. D - Biomassas aos 240 dias. Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $P \geq 0,05$ ). Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM. DM: dry mass; FM: fresh mass.

Aos 240 dias, a parte aérea das plantas do controle mediam 5,75 cm e as cultivadas em meio MS com BAP mediam em média 1,37 cm (Fig. 1C). As massas das plantas desses dois tratamentos não apresentaram diferenças aos 240 dias (Fig. 1D), apesar das plantas cultivadas em meio com BAP apresentarem o comprimento da parte aérea muito menor que as do controle ( $p < 0,000001$ ) (Fig. 1C).

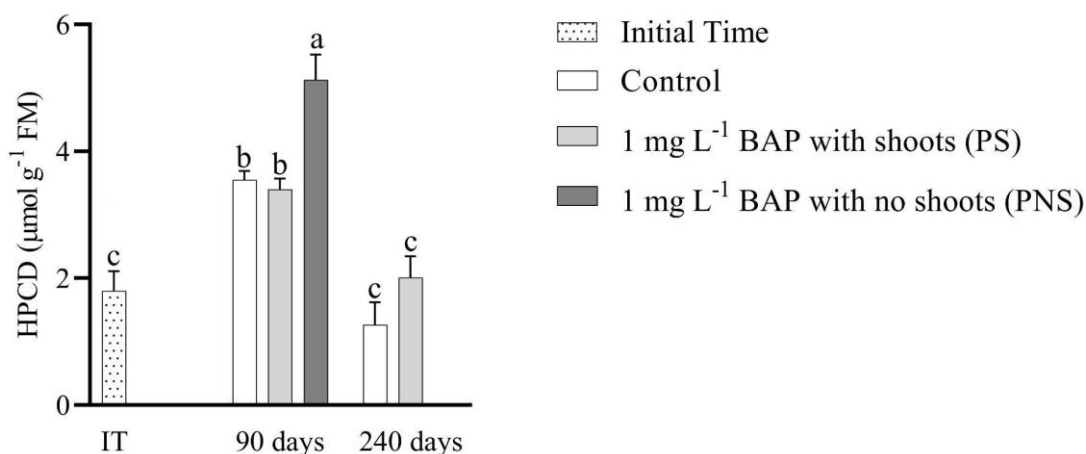
### Avaliação da Quantificação da Peroxidação Lipídica

Os resultados deste trabalho mostraram que os diferentes tratamentos in vitro originaram diferentes respostas em relação à brotação. Adotaremos, portanto, as seguintes abreviaturas: PNS (Plants with No Shoot) que se refere às plantas cultivadas por 90 dias em

meio MS com BAP que não continham brotos e PS (Plant with Shoots) para aquelas que apresentavam brotos.

A peroxidação lipídica (LPO), medida em nível de hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas (HPCD), aumentou aos 90 dias de incubação e apresentou uma diminuição aos 240 dias, ficando igual ao tempo inicial (Fig. 2).

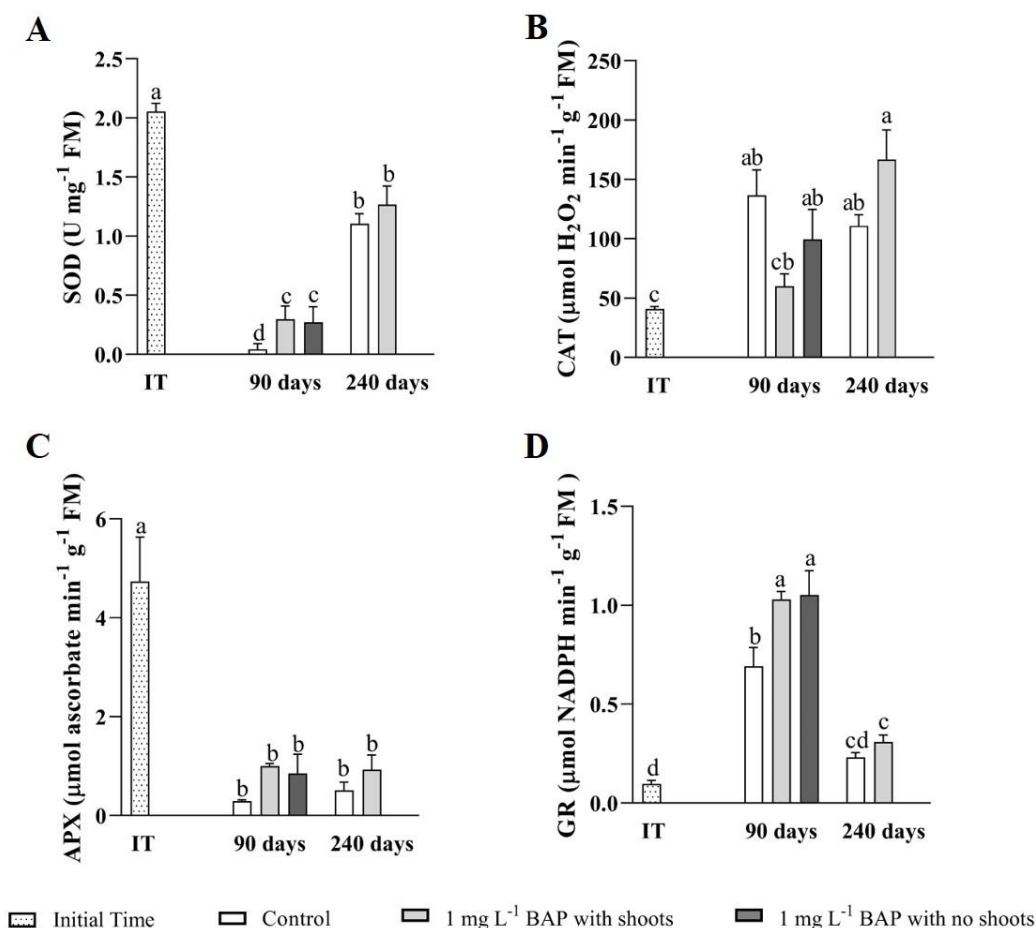
Aos 90 dias de cultura, as plantas do controle e as PS apresentaram níveis de LPO iguais entre si, mas superiores aos níveis das plantas do tempo inicial e das plantas cultivadas por 240 dias (Fig. 2).



**Figura 2:** Nível de peroxidação lipídica (LPO) em termos de conteúdo de hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas (HPDC) no período inicial (IT), aos 90 dias e 240 dias de *Nidularium minutum* cultivadas em meio MS com e sem BAP. Aos 90 dias, as plantas cultivadas em meio com BAP foram divididas em plantas com brotos (PS) e plantas com nenhum broto (PNS). Os dados indicados com letras iguais não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM.

#### Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da SOD diminuiu após as plantas permanecerem 90 dias incubadas, tanto para as PS quanto para as PNS. Houve uma menor atividade nas plantas do controle (Fig. 3A). Aos 240 dias, a atividade da SOD aumentou em relação às plantas cultivadas por 90 dias. Neste período, não houve diferença entre as plantas do controle e as plantas cultivadas em meio com BAP.



**Figura 3:** Atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e GR) de *Nidularium minutum* no período inicial (IT), aos 90 dias e aos 240 dias de plantas cultivadas em meio MS com ou sem BAP. Aos 90 dias, as plantas cultivadas em meio com BAP foram divididas em plantas com brotos (PS) e plantas com nenhum broto (PNS). Os dados indicados com letras iguais não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM.

A atividade da CAT aumentou aos 90 dias para plantas controle e para as PNS (Figura 3B). Aos 240 dias, as PS apresentaram aumento da atividade desta enzima. Quanto à atividade da APX, não houve diferença entre os 90 e 240 dias para todos os tratamentos (Figura 3C).

A maior atividade de GR foi observada nas plantas que permaneceram cultivadas por 90 dias, principalmente naquelas cultivadas com BAP. Porém, não houve diferença entre as PS e as PNS (Fig. 3D). Aos 240 dias, houve decréscimo da atividade desta enzima em relação aos 90 dias de cultivo.

### Análises Anatômicas

Aos 90 dias, verificou-se que 90% das plantas do grupo de controle e 50% das plantas cultivadas com BAP não apresentavam brotos visíveis a olho nu (PNS). As análises anatômicas

revelaram que tanto as plantas do grupo de controle quanto as do grupo com BAP apresentavam uma organização semelhante quanto à estrutura caulinar (Fig. 4A e B, respectivamente), exceto numa parcela de plantas dentre as PNS que tinham a região basal do caule intumescida (Fig. 4C), nas quais foram observadas gemas em desenvolvimento (Fig. 4D e E). Já as plantas com brotos (PS) apresentavam um intumescimento ainda maior da região basal do caule com gemas e brotos em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 5).

O intumescimento da base do caule ocorreu devido à proliferação de células parenquimáticas subepidérmicas que se diferenciaram em gemas. Esta diferenciação ocorreu de forma organizada, sem a formação de calo (organogênese direta). Primórdios foliares se originam a partir dos flancos do meristema apical caulinar (Fig. 4D e 5C). Entre a região das gemas e das células parenquimáticas foi possível observar uma zona de transição constituída por células menores e citoplasma mais denso dos que as células parenquimáticas (Fig. 4D e E).

Numerosos grãos de amido foram observados tanto nas células do parênquima da base intumescida do caule quanto na zona de transição das PNS (Fig. 4D e F). Nas PS (Fig. 5F), a quantidade de grãos de amido era bastante reduzida.

Deste modo, foi possível, portanto, identificar 3 estágios da organogênese direta dos brotos: intumescimento da base do caule, formação de gemas e desenvolvimento dos brotos.



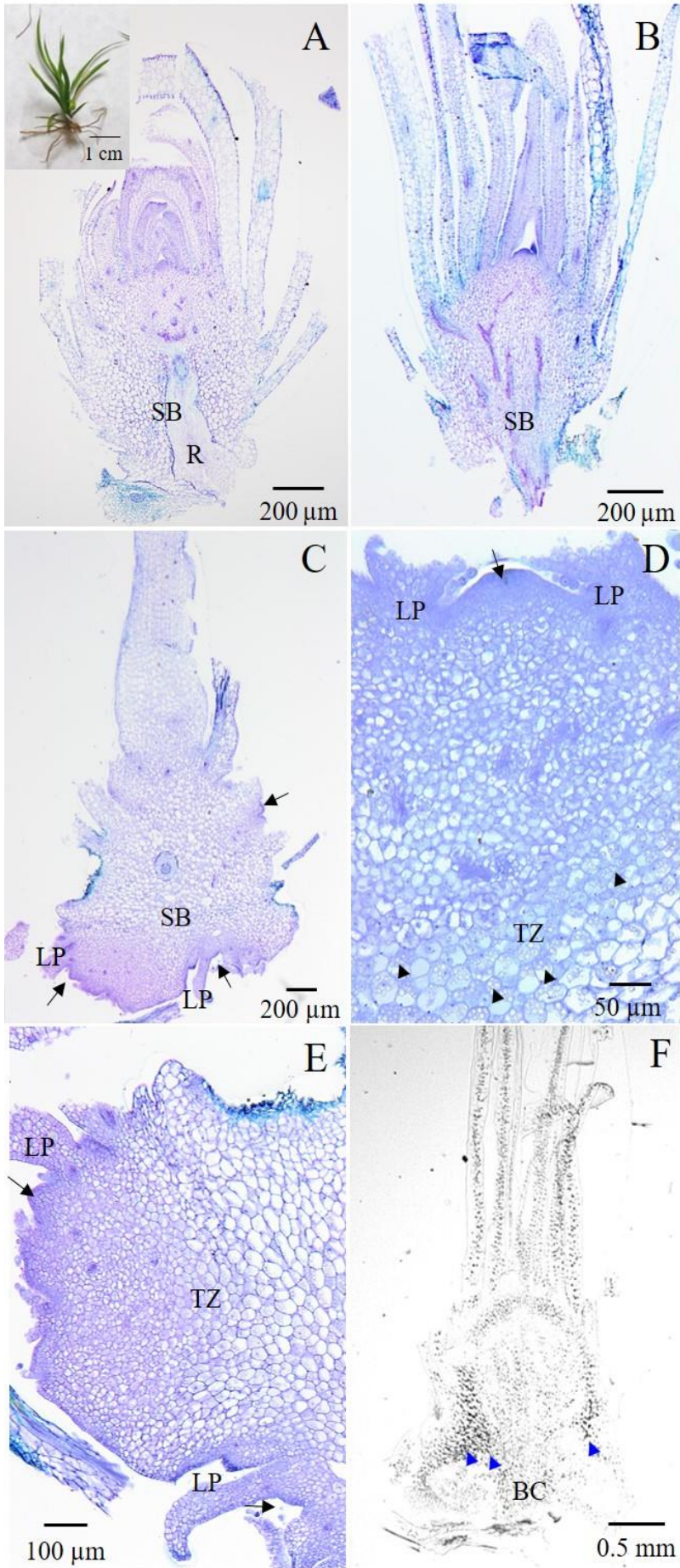


Figura 4: Cortes longitudinais do caule de plantas de *Nidularium minutum* cultivadas in vitro por 90 dias em meio MS sem e com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP. A - Controle; inset: planta antes de ser fixada em Karnovsky. B - Planta sem broto cultivada em meio MS com BAP. C - Planta sem broto cultivada em meio MS com BAP, mas com gemas na base intumescida do caule. D e E - Detalhes das gemas na base intumescida do caule de plantas sem brotos cultivadas em meio MS com BAP. F - Distribuição dos grãos de amido de uma planta sem broto cultivada em meio MS com BAP. Setas: gemas; cabeças de seta: grãos de amido. LP: primórdios foliares; MP: planta mãe; R: raiz; SB: base do caule; TZ: zona de transição.



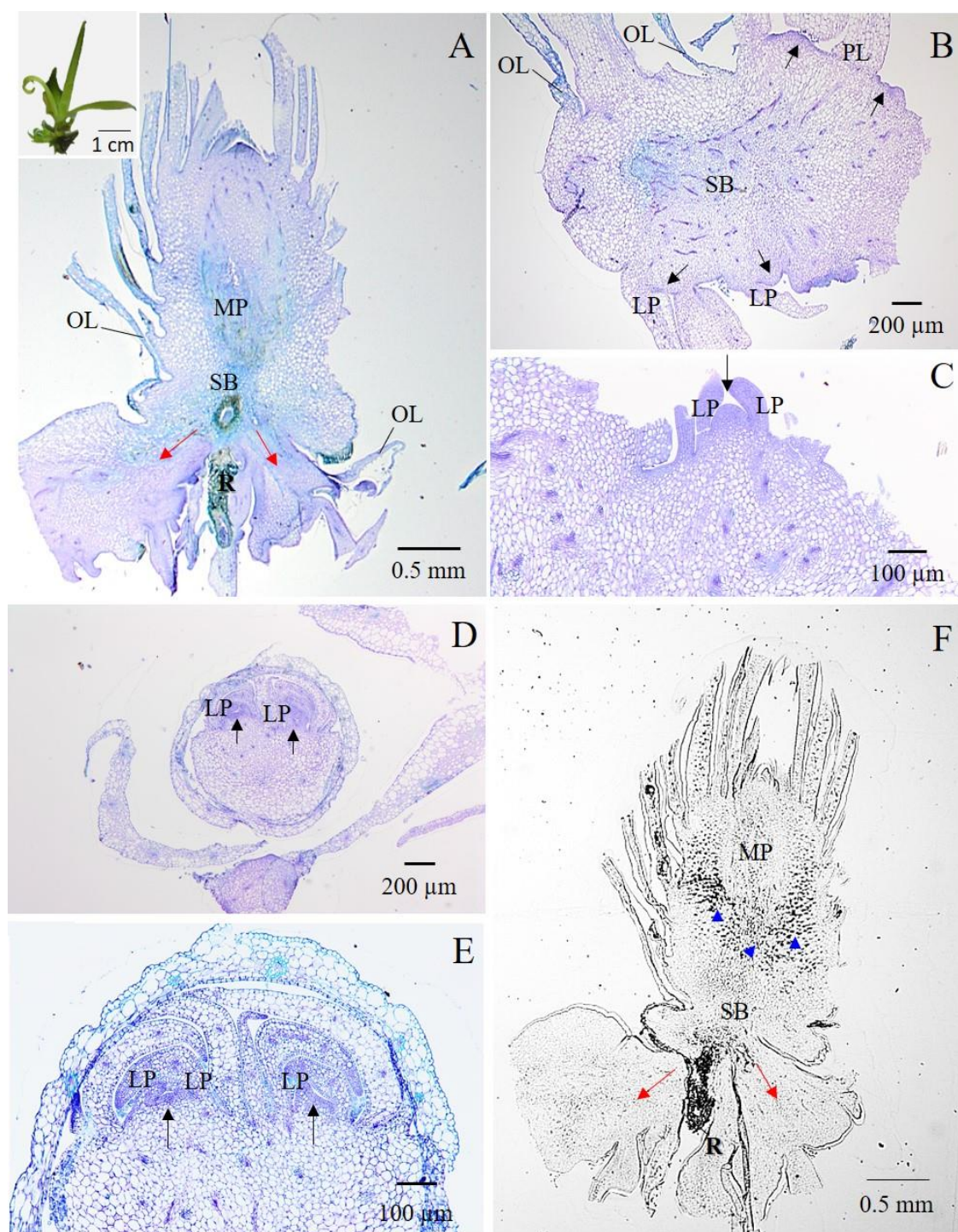


Figura 5: Cortes longitudinais do caule de plantas com brotos de *Nidularium minutum* cultivadas *in vitro* em meio MS com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP por 90 dias. A - Planta com dois brotos em desenvolvimento, inset: planta antes de ser fixada em Karnovsky. B-E - Detalhe das gemas e dos brotos formados na região basal do caule da planta. F - Distribuição dos grãos de amido de uma planta com brotos. Setas pretas: gemas; Setas vermelhas: brotos; cabeças de seta: grãos de amido; LP: Primórdios foliares. MP: planta mãe. OL: folha velha da planta mãe. R: raiz. SB: base do caule.

## DISCUSSÃO

O BAP intensificou a brotação em plantas de *N. minutum*. Esta citocinina é a mais utilizada na propagação in vitro, induzindo a produção de broto, devido à sua grande capacidade de atuar na parte aérea da planta (Bekircan et al. 2018; Komakech et al. 2020; Kornatskiy 2020), inclusive em Bromeliaceae (Martins et al. 2020, Silva et al. 2020, Oliveira et al. 2021, Marchi et al. 2022, Silva et al. 2022).

Os valores de massas obtidos para plantas que brotaram foram semelhantes às do controle. Entretanto, para as primeiras estes valores foram devidos ao intumescimento da base do caule nas plantas cultivadas com BAP por 240 dias, enquanto que para as plantas do controle o acúmulo ocorreu devido ao maior comprimento da parte aérea, evidenciando padrões de desenvolvimento diferente na presença da citocinina. Resultados semelhantes foram observados por Silva et al. (2022) no cultivo da bromélia *Aechmea setigera* cultivada em MS com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP quando observaram que o BAP influenciou o acúmulo de massa fresca e seca ao estimular a brotação, diminuindo o comprimento da parte aérea.

O intumescimento da região basal do caule de *N. minutum* foi devido à formação das gemas que se desenvolveram a partir da proliferação de células subepidérmicas. Não houve brotação das gemas axilares. As gemas da região basal do caule se formaram assincronicamente e se transformaram em brotos. Assim como em nosso trabalho, Graner et al. (2019) também observaram que as gemas axilares da bromélia *Neoregelia johannis* cultivada em meio com BAP e ácido naftaleno acético não brotaram. A brotação ocorreu a partir das células parenquimáticas da base do caule. Segundo estes autores, as células do parênquima podem atuar como células competentes para a organogênese, atuando como um nicho de células pluripotentes para direcionar a organogênese adventícia (brotos adventícios). Essas células se caracterizam por paredes celulares finas, citoplasma denso, alta relação nuclear citoplasmática e poucos e pequenos vacúolos.

Os numerosos grãos de amido presentes nas células do parênquima da base intumescida do caule e na zona de transição das PNS de *N. minutum*, observados neste trabalho, confirmam o uso desta reserva energética para a formação e o desenvolvimento dos brotos, pois houve redução destes compostos nas PS. Grenner et al. (2019) também observaram que há um consumo do amido à medida que a planta desenvolve mais brotos.

No início da diferenciação dos tecidos para a formação de brotos de *N. minutum* (aos 90 dias em meio com BAP), a LPO foi maior nas plantas que não brotaram, quando apresentaram o maior pico de conteúdo de HPCD. É possível supor que tenha havido uma maior peroxidação das membranas lipídicas, possivelmente por haver uma maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é uma ROS que pode participar da reação da peroxidação da membrana celular (Halliwell 2006). As

plantas de *N. minutum* com brotos apresentavam caule bastante intumescido por conterem inúmeras gemas meristemáticas. Segundo Zeng et al. (2017), a zona periférica dos meristemas apicais que promovem a diferenciação celular apresenta acúmulo de  $H_2O_2$ , enquanto o  $O_2^-$  é encontrado em maior quantidade na zona central da gema, onde as células se mantêm como meristemáticas. É possível supor que o tecido meristemático das gemas observadas em *N. minutum* apresentavam maior concentração de  $O_2^-$ , uma ROS que não oxida a membrana lipídica (Halliwell e Chirico 1993) e, por isso, apresentavam níveis reduzidos de LPO. Estudos histoquímicos para a localização dessas ROS durante as fases de brotação in vitro da *N. minutum* são necessários para comprovar esta hipótese.

Em nosso trabalho foi verificado que a transição do desenvolvimento de gemas para brotos foi acompanhada por diferenças nas atividades das enzimas antioxidantes. Estudos apontam para uma conexão clara entre o aumento das enzimas antioxidantes, a presença de ROS (radicais livres) e a diferenciação celular (Fujita et al. 2006; Zeng et al. 2017). Os resultados observados para *N. minutum* destacam a importância da regulação dos processos antioxidantes para a manutenção dos níveis basais das ROS, conforme apontado por Dumanovic et al. (2021).

A atividade da SOD diminuiu aos 90 dias de cultivo e aumentou aos 240 dias, quando não houve diferença entre os tratamentos. Zeng et al. (2017), estudando *Arabidopsis thaliana*, concluíram que a regulação da SOD é fundamental para o destino das células meristemáticas, pois esta enzima controla os níveis de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  nestas células, determinando a manutenção ou a diferenciação celular. Em *N. minutum*, a maior atividade da SOD em plantas cultivadas em meio com BAP aos 90 dias pode estar relacionada com o início da indução da brotação induzida pelo PGR. Resultados semelhantes foram observados para *Albizia odoratissima*, quando as atividades de SOD aumentaram durante a organogênese de brotos adventícios em comparação com culturas não morfogênicas (Rajeswari e Paliwal, 2008). Por outro lado, Mitrović et al. (2012) observaram que durante os estágios iniciais da organogênese de brotos em explantes foliares de *Tacitus bellus* houve diminuição da atividade da SOD, indicando que esta tendência pode variar conforme a espécie, além das condições de cultivo.

Alterações na SOD podem ser acompanhadas de variações da atividade da CAT, como reportado por Blazquez et al. (2009) nos estágios iniciais da embriogênese somática de *Crocus sativus*.

O aumento na atividade da CAT dos 90 para os 240 dias nas PS, observado no nosso trabalho, pode estar relacionado aos controles dos níveis de  $H_2O_2$  gerados em função da atividade da SOD. Fernández-García et al. (2004) relacionaram a CAT com o controle de  $H_2O_2$  durante a diferenciação de células meristemáticas em enxertos de tomate. Alguns trabalhos,

semelhante ao observado para *N. minutum* analisadas neste estudo, relatam o aumento da atividade da CAT durante a organogênese de plantas cultivadas em meio com a citocinina, como demonstrado para *Acanthophyllum sordidum* (Meratan et al. 2009), para *Gladiolus hybridus* (Dutta Gupta e Datta 2003) e para *Albizia odoratissima* (Rajeswari e Paliwal 2008). Relatos de Racchi e Terragna (1993) apontam que a atividade da CAT atua durante a diferenciação celular nos diferentes níveis da cultura de tecidos de milho (calogênese, embriogênese e organogênese). Segundo estes autores, esta enzima atua nas células meristemáticas, sua manutenção e sua supressão, durante a diferenciação celular.

Os níveis estáveis de APX aos 90 e 240 dias observados neste trabalho podem indicar que a atividade desta enzima provavelmente não está envolvida na indução da brotação por BAP, mas pode ser responsável pelo equilíbrio das reações de óxido redução. O papel da APX varia muito entre os trabalhos, por exemplo, em *Curculigo orchioides*, Dutta Gupta e Sahoo (2015) observaram uma alta atividade da APX após 14 dias de incubação em meio MS contendo BAP e maior acréscimo da atividade desta enzima nas culturas que apresentaram organogênese de brotos. Diferentemente, Abbasi et al. (2010) observaram decréscimo na atividade de APX durante a organogênese de calos de *Brassica rapa*. Entretanto, a maior atividade da GR detectada nas plantas de *N. minutum* que permaneceram cultivadas por 90 dias em meio com BAP, diminuindo aos 240 dias, pode estar relacionada com o início da indução da diferenciação induzida pelo BAP. Do mesmo modo, Jahan et al. (2014) observaram aumento da atividade de GR durante a brotação in vitro de hipocótilos de *Cardiospermum halicacabum*. Saha Dutta Gupta (2018) reportaram que a atividade de GR atingiu valores elevados durante as fases de proliferação de brotos em culturas de *Swertia chirata* cultivadas em MS com 4,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

No presente estudo, atividade da GR (Fig. 5D) e os teores de HPDC (Fig. 2) seguiram um mesmo padrão, aumentando aos 90 dias e diminuindo aos 240 dias. Estes dados sugerem que a peroxidação lipídica tem relação com a atividade da GR, pois esta enzima é responsável pelo equilíbrio das concentrações de glutatona reduzida (GSH) e dissulfeto de glutatona (GSSG) nos tecidos (Diaz e Shi, 2022). Sendo assim, para plantas de *N. minutum*, é provável que a GR possa estar relacionada ao início da indução da brotação, havendo redução de sua atividade aos 240 dias. Adicionalmente, a GR proporciona um ambiente redutor ao acoplar a oxidação do NADPH que, por sua vez, promove a redução do GSSG, produzindo GSH. A GSH elimina diretamente algumas ROS, com exceção do O<sub>2</sub><sup>-</sup>, e atua como um tampão, mantendo as proteínas em seu estado reduzido, e serve como substrato da GPX, que degrada o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Diaz e Shi 2022). Possivelmente, os diferentes teores de HPDC observados durante a brotação in vitro

de *N. minutum* podem ter relação com a atividade da GR, em cujo ciclo estão envolvidas as ROS  $H_2O_2$  e  $O_2^-$ .

## CONCLUSÃO

A brotação assincrônica da bromélia *N. minutum* in vitro é um processo contínuo, o qual é intensificado na presença de BAP, e é acompanhada de ajustes na atividade das enzimas do sistema antioxidante que controlam os níveis de ROS durante a diferenciação dos tecidos de gemas para brotos, cuja produção foi controlada principalmente pelas atividades da GR e da SOD. De modo interessante, este trabalho mostrou que os níveis de LPO não estavam relacionados a danos celulares e sim a quantidade de gemas ou tecido já diferenciado, pois nas plantas que brotaram os níveis de LPO foram menores em relação às plantas cultivadas em meio com BAP e não apresentavam brotos.

## Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (Processo 2017/50341-0) e à Marcia Regina Braga pela análise crítica do manuscrito.

## Referências

- Abbasi NA, Singh Z, Khan AS (2010) Dynamics of antioxidant levels and activities of reactive oxygen-scavenging enzymes in ‘Pink Lady’ apple fruit during maturation and ripening. Pak J Bot 42:2605-2620. 1. [https://http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42\(4\)/PJB42\(4\)2605.pdf](https://http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42(4)/PJB42(4)2605.pdf)
- Balen B, Tkalec M, Pavoković D, Pevalek-Kozlina B, Krsnik-Rasol M (2009) Growth conditions in in vitro culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. J Plant Growth Regul 28:36-45. <https://doi.org/10.1007/s00344-008-9072-5>
- Beauchamp C, Fridovich, I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 44:276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Bekircan T, Yaşar A, Yıldırım S, Sökmen M, Sökmen A (2018) Effect of cytokinins on in vitro multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. shoots. 3 Biotech 8:1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1206-2>
- Berlyn GP, Miksche JP (1976) Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames, The Iowa State Press.

- Bhattacharjee S (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr. Sci.*, 2005, 89, 58–67. <https://www.jstor.org/stable/24110963>
- Bhojwani SS, Razdan MK (1996) Cellular Totipotency. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. A Revised Edition. 5:95-123. <https://www.sciencedirect.com/bookseries/studies-in-plant-science/vol/5/suppl/C>
- Bijalwan P (2021) Plant Tissue Culture-A New Tool for Vegetable Improvement (Indian scenario): A Review. *Agric Rev* 42:235-239. <https://doi.org/10.18805/ag.R-1979>
- Blazquez S, Olmos E, Hernández JA, Fernández-García N, Fernández JA, Piqueras A (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 97:49-57. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9497-y>
- Brazil. (2022). Ministry of the Environment. Minister's office. Ordinance No. 148, of June 7th.
- Coelho N, Gonçalves S, González-Benito ME, Romano A (2012) Establishment of an in vitro propagation protocol for *Thymus lotocephalus*, a rare aromatic species of the Algarve (Portugal). *Plant Growth Regul* 66:69-74. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9630-x>
- Diaz JM, Shi X (2022) NOX-like ROS production by glutathione reductase. *Iscience* 25:105093. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105093>.
- Dobrąnszki J, Mendler-Drienyovszki N (2014) Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *J Plant Physiol* 171: 1472-1478. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.015>
- Dumanovic, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jaćević, V. (2021). The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in plant science*, 11, 552969.
- Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist* 174:332-341. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x>
- Dutta Gupta S, Datta S (2003) Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biol Plant* 47:179-183. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000022248.62869.c7>
- Dutta Gupta S, Sahoo, TK (2015) Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during in vitro shoot organogenesis of *Curculigo orchioides* Gaertn. *Acta Physiol Plant* 37:1-9. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1990-9>



- Farmer EE, Mueller MJ (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* 64:429-450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120132>
- Farooqui T, Farooqui A (2011) Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 01:09. <https://doi.org/10.4061/2011/247467>
- Fehér A (2019) Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. *Front Plant Sci* 10:536. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Fernández-García N, Carvajal M, Olmos, E (2004) Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Ann Bot* 93:53-60. <https://doi.org/10.1093/aob/mch014>
- Flores R, Kraetzig LC, Flôres PZ, Pereira DN, Büneker HM, Maldaner J, Viero CL, Strahl, M. A. (2018). Propagation of *Dyckia vicentensis*, an endemic bromeliad of the Pampa biome, Brazil. *Rodriguésia* 69:229-2235. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869447>
- Fosket DE (1994) Plant growth and development: a molecular approach. Academic Press, pp. 9-17
- Klein TM (2011) Particle bombardment; An established weapon in the arsenal of plant biotechnologists. In: Stewart CN, Touraev A, Citovsky V, Tzfira T (eds) *Plant transformation technologies*, Wiley-Blackwell, Ames West Sussex Oxford, pp 53–71
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 9:436-442. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.014>
- Gardner HW (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* 7: 65-86. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90102-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90102-0)
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Girotti AW (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39:1529-1542. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32182-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32182-9)
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57(5), 715S-725S.

- Hassan HM, Fridovich IRWN (1977) Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol Mycol* 129:1574-1583. <https://doi.org/10.1128/jb.129.3.1574-1583.1977>
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Functional metabolism: regulation and adaptation, LUGAR. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413:383-389. <https://doi.org/10.1038/35096500>
- Jahan AA, Anis M, Aref IM (2014) Relative examination of antioxidative enzymatic activities in plantlets of *Cardiospermum halicacabum* L. differentiated from hypocotyls in in vivo and ex vitro environment. *Biotechnol Rep* 4:66-72. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.08.004>
- Jairam V, Uchida K, Narayanaswami V (2012) Pathophysiology of lipoprotein oxidation. *Lipids Health Dis* 383. <http://dx.doi.org/10.5772/50622>
- Komakech R, Kim YG, Kim WJ, Omujal F, Yan S, Moon BC, Okello D, Rahmat E, Kyeyune GN, Matsabisa MG, Kang Y (2020). A micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (hook f.) kalkman: genetic fidelity and physiological parameter assessment. *Front Plant Sci* 11:548003. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.548003>
- Kornatskiy, SA (2020) Pineapple micropropagation (*Ananas comosus* L.) and plant growth features in the process of adaptation in hydroponics. *J Crit Ver* 7:3228-3234.
- Kurita FMK, Machado BDM, Teixeira NB, César CDA, Nievola CC. Tamaki, V (2014) Phenology, in vitro cultivation, and acclimatization of the endangered bromeliad species *Nidularium minutum* Mez. *Biotemas* 27:59-69. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2014v27n1p59>
- Leme EM (2009) A new *Nidularium* species from the Atlantic Forest of Sao Paulo State, Brazil, and issues against nominal extinction. *J Bromel Soc* 59:245-256. <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&u=googlescholar&id=GALE|A229833540&v=2.1&it=r&sid=AONE&asid=e58c31f4>
- Levin AG, Pignata ML (1995) *Ramalina ecklonii* as a bioindicator of atmospheric pollution in Argentina. *Canad J Bot* 73:1196-1202. <https://doi.org/10.1139/b95-129>
- Lima APPS, Brito AL, Santana JRFD (2020) Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. *Cienc Rural* 50. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180922>

- Liszka A, Zalm E, Schopfer P (2004) Production of reactive oxygen intermediates ( $O^{2-}$ ,  $H_2O_2$ , and  $\cdot OH$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 136:3114-3123. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044784>
- Longo V, Kamran RV, Michaletti, A, Toorchi, M, Zolla, L, Rinalducci, S (2017). Proteomic and physiological response of spring barley leaves to cold stress. *Cell* 6:7. <https://www.jscimedcentral.com/public/assets/articles/plantbiology-5-1061.pdf>
- Luck, H. (1965) Catalase. In: Bergmeyer, H.U., Ed., *Method of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York and London, 885-894. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-395630-9.50158-4>
- Mane AV, Ambawade MS, Pathade, GR (2010) Cadmium chloride induced biochemical changes in *Triticum aestivum* (L) Var. MP LOK 1. *Nat Environ Pollut* 9:691-698. [https://neptjournal.com/upload-images/NL-20-8-\(8\)-B-1574.pdf](https://neptjournal.com/upload-images/NL-20-8-(8)-B-1574.pdf)
- Marchi, M. S., Ornellas, T. S., Fritsche, Y., Guerra, M. P., & Stefenon, V. M. (2022). Morphometric parameters and photosynthetic performance of in vitro propagated pineapple. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 121.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa, AFD, Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguesia* 59, 209-258. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859114>
- Martins, J. P. R., Rodrigues, L. C. D. A., Silva, T. D. S., Gontijo, A. B. P. L., & Falqueto, A. R. (2020). Modulation of the anatomical and physiological responses of in vitro grown *Alcantarea imperialis* induced by NAA and residual effects of BAP. *Ornamental Horticulture*, 26, 283-297.
- Martins JPR, Santos ER, Rodrigues LCA, Gontijo ABPL, Falqueto AR (2018) Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of in vitro cultivated *Aechmea blanchetiana*. *Biol Plant* 62:793-800. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0822-3>
- Meratan AA, Ghaffari SM, Niknam V (2009) In vitro organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. *Biol Plant* 53:5-10. <https://doi.org/10.1007/s10535-009-0002-6>
- Mitrović A, Janošević D, Budimir S, Bogdanović Pristov, J (2012) Changes in antioxidative enzymes activities during *Tacitus bellus* direct shoot organogenesis. *Biol Plant* 56:357-361. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0098-y>
- Mittler R (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci* 22:11-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>

- Mostofa MG, Hossain MA, Siddiqui MN, Fujita M, Tran LSP (2017) Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. *Chemosphere* 178:212-223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.046>
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Nievola CC, Carvalho CP, Carvalho V, Rodrigues E. (2017) Rapid responses of plants to temperature changes. *Temp* 4:371-405. <https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1377812>
- Oliveira, A. M. S., Peixoto, P. H. P., Barbosa, B. C., & Faria, A. P. G. (2021). Reproductive success, herbivory and ex situ conservation of *Neoregelia ibitipocensis* (Bromeliaceae): an endemic and endangered species from the Atlantic Forest. *Australian Journal of Botany*, 69(4), 237-246.
- Ördögh M (2015) The effect of different cytokinins on chlorophyll content and morphological features of in vitro *Nidularium* 'Kertész Jubileum'. *Int J Horticult Sci* 21:47-51. <https://doi.org/10.31421/IJHS/21/1-2./1157>
- Paiva PDO, Naves VC, Dutra LF, Paiva R, Pasqual M (2009) In vitro propagation of *Nidularium fulgens*. *Interciencia* 34:593-596. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33913144012>
- Pierik RLM, Steegmans HHM (1984) Vegetative propagation of *Nidularium fulgens* Lem. in vitro. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 32:101-106. <https://doi.org/10.18174/njas.v32i2.16909>
- Pinto MC, Gara, L (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *J Exp Bot* 55:2559-2569. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh253>
- Racchi ML, Terragna C (1993) Catalase isozymes are useful markers of differentiation in maize tissue cultures. *Plant Sci* 93:195-202. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90049-6)
- Rademacher W (2015) Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *J Plant Growth Regul* 34:845-872. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>
- Rajeswari V, Paliwal K (2008) Peroxidase and catalase changes during in vitro adventitious shoot organogenesis from hypocotyls of *Albizia odoratissima* Lf (Benth). *Acta Physiol Plant* 30:825-832. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0187-x>

- Recknagel, R. O., & Glende Jr, E. A. (1984). [40] Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 331-337). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05043-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05043-6)
- Saha N, Dutta Gupta S (2018) Promotion of shoot regeneration of *Swertia chirata* by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene interceptions and activation of antioxidant activity. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 134:289-300. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1423-8>
- Silva ALL, Costa JDL, Alcantara GB, Carvalho DC, Schuck MR, Biasi LA, Scheidt GN, Socol ACR (2012) Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). *Pak J Bot* 44:1095-1101. <http://www.pakbs.org/.../38.pdf>
- Silva SSS, Souza EH, Souza FVD, Nepomuceno CF., Carvalho Costa, M. A. P. (2020). Micropropagation and in vitro conservation of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), an endemic and endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 42, e52940-e52940. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v42i1.52940>
- Silva TC, Luiz C, de Oliveira MT, Borghezan M, Pescador R, Junior PCPF (2022) Physiological responses of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) in vitro cultured. *J Biotechnol Biodivers* 10:016-025. <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v10n1.silva>
- Skorzynska-Polit E (2007) Lipid peroxidation in plant cell, its physiological role and changes under heavy metal stress. *Acta Soc Bot Poloniae* 76:49–54. <https://doi.org/10.5586/asbp.2007.006>
- Schaedle M, Bassham JA (1977) Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol* 59:1011-1012. <https://doi.org/10.1104/pp.59.5.1011>
- Souza RR, Oliveira Paiva PDO, Souza AR, Silva RR, Silva DPC, Reis MV, Paiva R (2021) Morpho-anatomical changes and antioxidant enzyme activity during the acclimatization of *Genipa americana*. *Acta Physiol Plant* 43:1-10. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03263-9>
- Triantaphylides C, Krischke M, Hoerberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Breusegem FV, Mueller MJ (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol* 148:960-968. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125690>

- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143:606-616. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.020>
- Ustin SL, Gitelson AA, Jacquemoud S, Schaepman M, Asner GP, Gamon JA, Zarco-Tejada P (2009). Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. *Remote Sens Environ* 113:S67-S77. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2008.10.019>
- Weng XY, Zheng CJ, Xu HX, Sun JY (2007) Characteristics of photosynthesis and functions of the water–water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. *Physiol Plant* 131:614-621. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00978.x>
- Yaroshevich IA, Krasilnikov PM, Rubin AB (2015) Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations. *Comput Theor Chem* 1070:27-32. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2015.07.016>
- Zeng J, Dong Z, Wu H, Tian Z, Zhao, Z (2017) Redox regulation of plant stem cell fate. *EMBO J* 36:2844-2855. <https://doi.org/10.15252/emj.201695955>
- Zizka A, Azevedo J, Leme E, Neves B, Costa AF, Caceres D, Zizka G (2020). Biogeography and conservation status of the pineapple family (Bromeliaceae). *Divers Distrib*, 26:183-195. <https://doi.org/10.1111/ddi.13004>
- Zrig A, Mohamed HB, Tounekti T, Ahmed SO, Khemira H (2015) Differential responses of antioxidant enzymes in salt-stressed almond tree grown under sun and shade conditions. *J Plant Sci Res*. 2:1-10. <https://www.opensciencepublications.com/fulltextarticles/JPSR-2349-2805-2-117.html>

### **Capítulo III**

Este capítulo é um estudo cujo o objetivo foi analisar a anatomia *de Nidularium minutum* cultivada in vitro e identificar quais são as estruturas prováveis que esta planta possui que podem garantir o sucesso da aclimatização.

Pretende-se submeter o artigo para o periódico “South African Journal of Botany”.

## Caracterização anatômica de *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae) cultivada in vitro

Maria Gessi Teixeira<sup>1,2,3</sup>, Magda Andréia Tessmer<sup>4</sup>, Catarina Carvalho Nievola<sup>2</sup>, Adriana Hissae Hayashi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Ambientais, Av. Miguel Estéfano, 3687, Água Funda, 04301-902 - São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Pesquisas Ambientais, Núcleo de Conservação da Biodiversidade, Av. Miguel Estéfano, 3687, Água Funda, 04301-902 - São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Laboratório de Biotecnologia, Rodovia Machado - Paraguaçu, km 3 - Bairro Santo Antônio, 37750-000 - Machado, MG, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Ciências Biológicas, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900 - Piracicaba, SP, Brasil.

Corresponding author: Maria Gessi Teixeira - maria.teixeira@ifsuldeminas.edu.br

### RESUMO

Certos atributos anatômicos das Bromeliaceae são relacionados com a conservação de água nos tecidos da planta. Estes caracteres podem ser importantes para o sucesso da aclimatização que muitas espécies desta família apresentam após cultivo in vitro. O objetivo deste estudo foi identificar estruturas anatômicas de *Nidularium minutum*, uma espécie vulnerável com potencial ornamental, que poderiam contribuir para o sucesso do estabelecimento ex vitro após crescimento in vitro. Para isso foram realizadas análises anatômicas em microscopia óptica e eletrônica de varredura dos órgãos vegetativos de plantas cultivadas in vitro por 90 dias. Foi observada a presença de estruturas que podem atuar prevenindo a desidratação, como escamas foliares, parênquima aquífero foliar e raízes intracorticais, além de coléteres no ápice caulinar (não comumente reportados para Bromeliaceae). Concluiu-se que este conjunto de caracteres anatômicos pode favorecer o estabelecimento ex vitro de *N. minutum* após cultivo in vitro.

**Palavras-chave:** Anatomia de órgãos vegetativos; Atributos anatômicos; Bromélia; Coléteres; Micropropagação.



## 1 INTRODUÇÃO

As bromélias são bastante empregadas como plantas ornamentais devido às suas inflorescências que duram meses e à atrativa disposição em roseta de suas folhas (Negrelle et al., 2012). Consequentemente, a coleta predatória de exemplares para comercialização e a depredação do ambiente natural tem causado redução de inúmeras espécies, muitas vezes levando-as à extinção (Pereira et al., 2008).

Uma maneira de preservação de espécies ameaçadas é o cultivo in vitro. Esta técnica tem sido considerada uma importante ferramenta para a propagação em massa de bromélias, subsidiando a produção comercial de espécies ornamentais e fornecendo plantas micropropagadas para reintrodução no habitat natural (Huang et al., 2011), tendo assim grande potencial para a conservação de espécies de plantas raras, ameaçadas ou em risco de extinção (Shahzad et al., 2017). Adicionalmente, a obtenção de plantas a partir de germinação in vitro é vantajosa, pois cada fruto de bromélia pode conter muitas sementes, como por exemplo *N. minutum*, que possui por volta de 200 sementes por fruto e taxa de germinação in vitro superior a 60% (Kurita et al., 2014).

Um dos pontos críticos da micropropagação é a fase da aclimatização, quando a planta passa do ambiente in vitro para o ex vitro. Muitas espécies de plantas não sobrevivem neste processo porque no ambiente in vitro a atmosfera é saturada com altíssima umidade, temperatura constante ou com pouca variação, fonte de carbono pronta, presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo, baixa concentração de CO<sub>2</sub> e alta concentração de etileno no ar. Todos estes fatores contribuem para que a planta apresente anomalias anatômicas (Martins et al., 2020; Manokari et al., 2021) e, consequentemente, dificuldade de sobrevivência durante a adaptação ao ambiente ex vitro, como relatado por vários autores (Lima-Brito et al., 2016; Campos et al., 2019; Duan et al., 2020). Sendo assim, avaliações anatômicas em plantas cultivadas in vitro são importantes para entender o desenvolvimento em condições heterotróficas e elucidar desequilíbrios morfológicos gerados durante o cultivo, podendo assim aprimorar o estabelecimento da cultura (Moyo et al., 2015).

Diferentemente do que é relatado para algumas outras espécies, trabalhos com cultivo in vitro de Bromeliaceae mostram que as plantas desta família apresentam sucesso na aclimatização (Flores et al., 2018; Lima et al., 2020; Alves et al., 2022; Bertsouklis e Panagaki, 2022; Ördögh, 2022). Caracteres anatômicos presentes nas bromélias, como estrutura das raízes, arquitetura da parte aérea e diferentes aspectos funcionais dos tricomas foliares (absorventes, refletores ou atratores), são capazes de favorecer o balanço hídrico e a nutrição mineral. Estes caracteres contribuem para a sobrevivência destas plantas em diferentes

situações ambientais, além de possibilitar que ocupem diferentes habitats (terrícola, epífita, saxícola, rupícola) (Benzing, 2000).

A bromélia *Nidularium minutum* é terrícola e possui potencial ornamental (Leme, 2000). É endêmica do Estado de São Paulo, considerada vulnerável na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2022). Estudos com a aclimatização desta bromélia cultivada *in vitro* demonstraram que há alta taxa de sobrevivência durante a adaptação ao ambiente *ex vitro*. Kurita et al. (2014) obtiveram 100% de sobrevivência após 90 dias de aclimatização de plantas cultivadas *in vitro* sem reguladores de crescimento. Teixeira e Nievola (2023), ao avaliarem a micropropagação desta mesma espécie em meio de cultura com diferentes concentrações de reguladores, também observaram a sobrevivência de todas as plantas após 60 dias de aclimatização. Neste sentido, supomos que as bromélias apresentam estruturas anatômicas que competem a elas facilidade de sobrevivência na mudança do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a anatomia de plantas de *N. minutum* cultivadas *in vitro* e identificar quais são as estruturas que poderiam garantir o sucesso do estabelecimento *ex vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de material vegetal

As plântulas foram obtidas a partir da germinação de sementes de *Nidularium minutum* Mez coletadas de plantas da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, São Paulo, SP, Brasil (23°46'18"-23°47'05" Latitude Sul e 46°20'24"-46 °18'15" Longitude Oeste). A desinfestação das sementes foi feita com etanol 70% por 2 minutos e alvejante comercial (cloro ativo 2,5%) mais Tween 20 (Labsynth, Brasil) por 15 minutos. As sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada estéril e colocadas em frascos contendo meio para germinação composto por água destilada suplementada com sacarose (2%) e solidificada com ágar (0,6%), a pH 5,8 (Kurita et al., 2014). Os frascos com as sementes foram mantidos em sala de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 16 horas por 40 dias.

Após este período, as plântulas foram transferidas para meio MS suplementado com sacarose (30 mg L<sup>-1</sup>), glicina (2 mg L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0,5 mg L<sup>-1</sup>), piridoxina-HCl (0,5 mg L<sup>-1</sup>), tiamina-HCl (0,1 mg L<sup>-1</sup>) e ágar 0,6%. O pH foi ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas por 90 dias em sala de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 16 h (~100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

## 2.2 Análises anatômicas

Cinco plantas obtidas após 90 dias em cultivo *in vitro* foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e, em seguida, o material foi levado a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Precedendo a inclusão em resina histológica (Leica HistoResin), as amostras da lâmina foliar, caule e raiz foram desidratadas em série etílica das concentrações de 10 a 100%. O material incluído foi seccionado transversal e longitudinalmente na espessura de 7  $\mu\text{m}$  em micrótomo rotatório (Leica RM2245) com navalha de aço descartável. Os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão fosfato e citrato (McIlvaine, 1921) pH 4,5. Para montagem das lâminas permanentes foi usada resina Entellan.

Testes histoquímicos foram realizados para identificar substâncias lipofílicas pelo Sudan IV (Jensen, 1962) e substâncias pécticas e mucilagens pelo vermelho de rutênio (Johansen, 1940).

A análise da epiderme foliar foi feita por meio da impressão paradérmica com cola instantânea (éster de cianoacrilato) (Segatto et al., 2004) ou por corte paradérmico do material incluído em historresina.

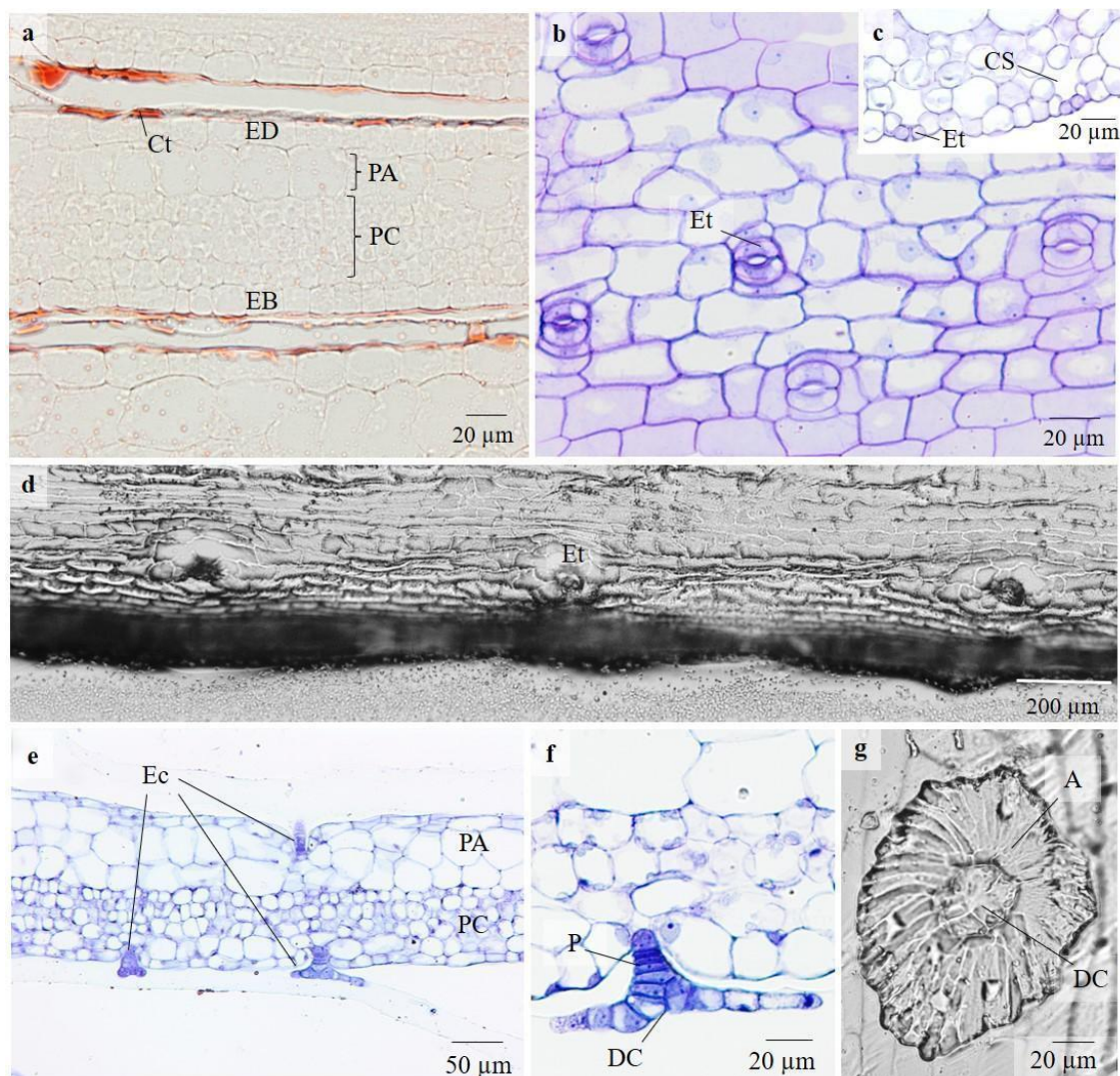
As imagens foram capturadas por câmera Olympus SC100 usando o programa Olympus CellSens Standard v.3.2, ao microscópio óptico Olympus BX41.

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras dos ápices caulinares foram fixadas em solução de Karnovsky e desidratados em série etílica, secas pelo método do ponto crítico com  $\text{CO}_2$  (Horridge e Tamm, 1969) e metalizadas com ouro. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-IT 300.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Lâmina foliar

A epiderme da lâmina foliar de *N. minutum* é uniestratificada com as células da face adaxial maiores em relação à face abaxial (Fig. 1a, e). Segundo Carvalho et al. (2013), a espessura das células da epiderme foliar de *N. minutum* crescidas *in vitro* pode variar conforme a temperatura. Estes autores constataram que as células epidérmicas da face adaxial de plantas cultivadas a 10 e 15 °C eram mais espessas em comparação com plantas cultivadas a 25 °C.



**Figura 1:** Lâmina foliar de *Nidularium minutum* cultivada in vitro em meio MS por 90 dias; **a** - Corte longitudinal mostrando as faces adaxial e abaxial da epiderme revestida pela cutícula fina e irregular corada com Sudan IV. **b** - Estômatos da face abaxial em corte paradérmico. **c** - Estômatos e respectivas câmaras subestomáticas na face abaxial da lâmina foliar em corte transversal. **d** - Estômatos da face adaxial do bordo foliar em impressão paradérmica. **e** - Corte longitudinal mostrando escamas nas duas faces foliares. **f** - Detalhe da escama em corte longitudinal. **g** - Impressão paradérmica da escama em vista frontal. A: asa da escama; CS: câmara subestomática; Ct: cutícula; DC: disco central da escama; EB: epiderme da face abaxial; ED: epiderme da face adaxial; Ec: escama; Et: estômato; P: pedicelo; PA: parênquima aquífero; PC: parênquima clorofiliano.

A cutícula foliar de *N. minutum* é fina e irregular (Fig 1a). Barboza et al. (2006) também observaram cutícula pouco desenvolvida tanto na face adaxial quanto na face abaxial da epiderme foliar de *Ananas comosus* (Bromeliaceae) cultivado in vitro. A má formação, ou até mesmo a ausência de cutícula é uma característica comum em plantas crescidas in vitro

(Hazarika et al., 2001; Suárez et al., 2019; Din et al., 2020). Nestas plantas, pode ocorrer redução da espessura da cutícula foliar devido ao ambiente fechado do vidro, que possui atmosfera com alta umidade relativa e escassas trocas gasosas dentro do recipiente (George et al., 2008). Esta condição pode desfavorecer a sobrevivência da planta durante a aclimatização, pois a cutícula é um dos principais mecanismos de defesa da planta contra a perda excessiva de água (Louro et al., 2003).

A lâmina foliar de *N. minutum* é anfiestomática (Fig. 1b-d). Os estômatos são tetracíticos (Fig. 1b), conforme classificação já mencionada para Bromeliaceae (Tomlinson, 1969), e se encontram em um mesmo nível ou levemente acima das demais células epidérmicas (Fig. 1c, 2a). O mesmo acontece nas bromélias *Tillandsia* (Oliveira et al., 2022) e *Vriesea* (Silva et al., 2020a; Faria et al., 2021) e em *Pitcairnia mineira* (Carvalho e Forzza, 2022), *Pitcairnia burchellii* (Ballego-Campos et al., 2022) e *Billbergia euphemiae* (Zorger et al., 2019). Os estômatos em *N. minutum* estão distribuídos predominantemente pela face abaxial (Fig. 1b, c), porém são encontrados também junto ao bordo foliar na face adaxial (Fig. 1d), como observado em *Acanthostachys strobilacea* por Carvalho (2022).

Os tricomas foliares de *N. minutum* são do tipo peltados e denominados escamas (Fig. 1e-g). São encontrados nas faces adaxial e abaxial e por toda a extensão da folha (Fig. 1e-g). Estes tricomas são constituídos pelo pedicelo e escudo, sendo o escudo formado por um disco central circundado pela asa (Fig. 1g). As células da asa são alongadas e estão dispostas radialmente (Fig. 1g). O escudo está posicionado paralelamente à superfície da folha (Fig. 1e, f, 2a). Este tipo de tricoma é considerado uma sinapomorfia para a família. Estas estruturas desempenham várias funções como absorção de água e sais minerais, proteção contra herbivoria e agentes patogênicos, reflexão da radiação solar, redução da transpiração e atração de polinizadores e dispersores de sementes (Benzing, 2000).

Em nosso estudo foi constatado que as células da asa de *N. minutum* são vivas, possuem núcleo e conteúdo citoplasmático, assim como reportado por Kowalski et al. (2016) e Kleingesinds et al. (2018) para outras espécies de bromélias. Entretanto, trabalhos anteriores relataram que as células da asa dos tricomas, quando atingem seu desenvolvimento completo, são estruturas mortas, não tendo presente o conteúdo celular (Tomlinson, 1969; Benzing, 1976).

O mesofilo da lâmina foliar de *N. minutum* é heterogêneo, constituído por parênquima aquífero adjacente à epiderme na face adaxial e parênquima clorofiliano na face abaxial (Fig. 1a, e; 2a, b). O número de camadas de células varia ao longo da lâmina foliar. O parênquima clorofiliano e o aquífero apresentam de 3 a 4 camadas na região central da lâmina foliar e diminuem gradativamente em direção ao bordo até uma camada de clorofiliano e ausência do



aquífero (Fig. 2a). O parênquima aquífero é formado por células grandes e arredondadas, com paredes delgadas, já o parênquima clorofiliano apresenta células menores com formato irregular. Ao longo do mesofilo são encontrados idioblastos contendo ráfides e mucilagem (Fig. 2a-c). Idioblastos com ráfides também são encontrados em várias espécies de outros gêneros de Bromeliaceae, tais como *Bromelia* (Monteiro et al., 2011), *Tillandsia* (Souza et al., 2020), *Aechmea* (Silva et al., 2020b), *Vriesea*, *Lutheria*, *Fosterella* e *Guzmania* (Siqueira et al., 2023). As ráfides são compostas de cristais de oxalato de cálcio e desempenham um papel na regulação do cálcio nas células vegetais, tendo importância ecológica tanto na reflexão da luz solar, quanto na distribuição uniforme da luz nas plantas em ambientes sombreados, além de atuar na defesa contra herbívoros (Franceschi e Nakata 2005, Paiva 2021). Segundo Finley (1999) e Prychid e Rudall (1999), as ráfides de oxalato de cálcio tornam as plantas pouco palatáveis aos herbívoros.

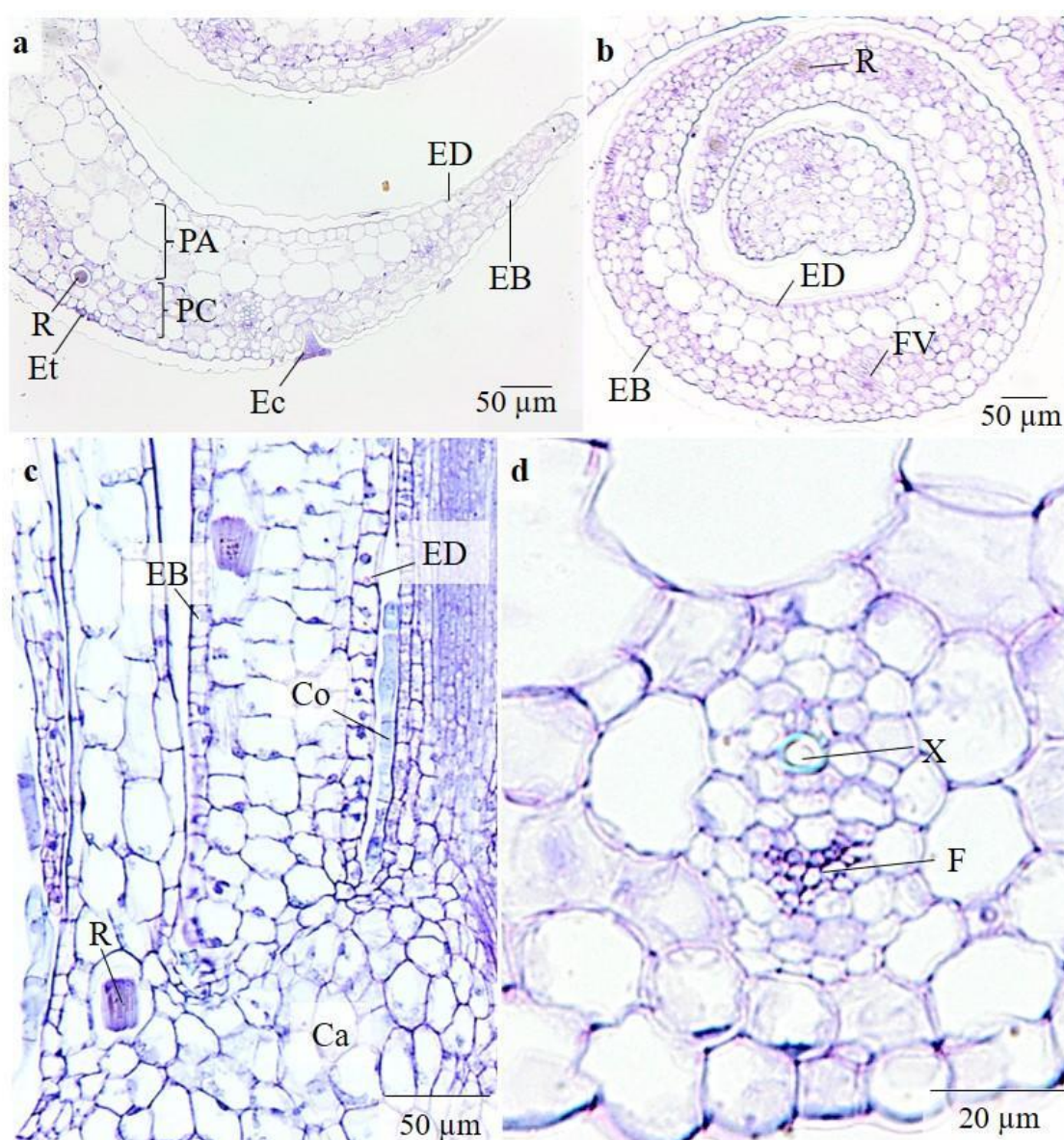


Figura 2: Cortes transversais (a,b,d) e longitudinal (c) da lâmina foliar de *Nidularium minutum* cultivada in vitro em meio de cultura MS por 90 dias. **a** - Detalhe do bordo. **b** - Lâmina foliar. **c** - Detalhe dos idioblastos contendo ráfides e mucilagem; **d** - Feixe vascular. Ca: caule; Co: coléter; EB: epiderme da face abaxial; ED: epiderme da face adaxial; Ec: escama; Et: estômato; F: floema; FV: feixe vascular; PA: parênquima aquífero; PC: parênquima clorofiliano; R: ráfides; X: xilema.

O parênquima aquífero é um tecido de armazenamento de água que confere suculência às plantas e pode atuar como um suprimento de água para células fotossinteticamente ativas (Ogburn e Edwards, 2010). Adicionalmente, os grandes vacúolos presentes nas células armazenadoras de água deste tecido podem acumular solutos osmoticamente ativos (osmólitos) que auxiliam na manutenção do turgor por meio de ajuste osmótico (Nikalje et al., 2018). Carvalho (2022), estudando *Acanthostachys strobilacea*, observaram que quando esta bromélia é submetida à seca, há uma rápida mobilização de água do parênquima aquífero para o clorofiliano, evitando a desidratação dos tecidos. Sendo assim, a presença do parênquima aquífero pode evitar a perda excessiva de água em plantas transferidas do ambiente in vitro para o ex vitro. Trabalhos de micropropagação com outras plantas que possuem parênquima aquífero relatam alta taxa de sobrevivência após período de adaptação das plantas ao ambiente externo. Malda et al. (1999), estudando *Coryphantha minima* (Cactaceae) cultivado in vitro, observaram que, embora a perda de água tenha sido relativamente significativa durante a adaptação ex vitro, a sobrevivência não foi afetada, sugerindo que a suculência da planta permitiu a sobrevivência após aclimatização. Ao micropropagarem *Aloe vera* (Asphodelaceae), outra planta suculenta, Manokari et al. (2021) obtiveram 100% de sobrevivência após a aclimatização. Resultados semelhantes foram obtidos por Jayaprakash et al. (2023) na aclimatização da suculenta *Caralluma umbellata* (Asclepiadaceae) também cultivada in vitro.

Os feixes vasculares de *N. minutum* são encontrados imersos no parênquima clorofiliano e estão dispostos de forma alinhada em uma única série ao longo da lâmina foliar (Fig. 2b). São do tipo colateral e estão envoltos por uma bainha parenquimática (Fig. 2d). Tais caracteres também foram encontrados em diversas outras espécies de bromélias, tais como *Araeococcus* (Pontes et al., 2019), *Vriesea* (Faria et al., 2021) e *Pitcairnia mineira* (Carvalho e Forzza, 2022).

### 3.2 Caule

O ápice caulinar de *N. minutum* está envolvido pelos primórdios foliares e folhas jovens os quais se originam a partir do meristema apical (Fig. 3a, c; 4a, b). Nesta região do caule são



encontrados tricomas do tipo coléteres (Fig. 2c, 3). Estes tricomas estão comprimidos nas regiões axilares das folhas devido aos entrenós serem muito próximos e são encontrados principalmente nas porções mais jovens do caule, adjacentes à toda a extensão da bainha foliar (Fig. 3d). O pedicelo destes coléteres é multisseriado e em seu ápice estão conectadas células alongadas formando estruturas digitiformes (Fig. 3b, e).

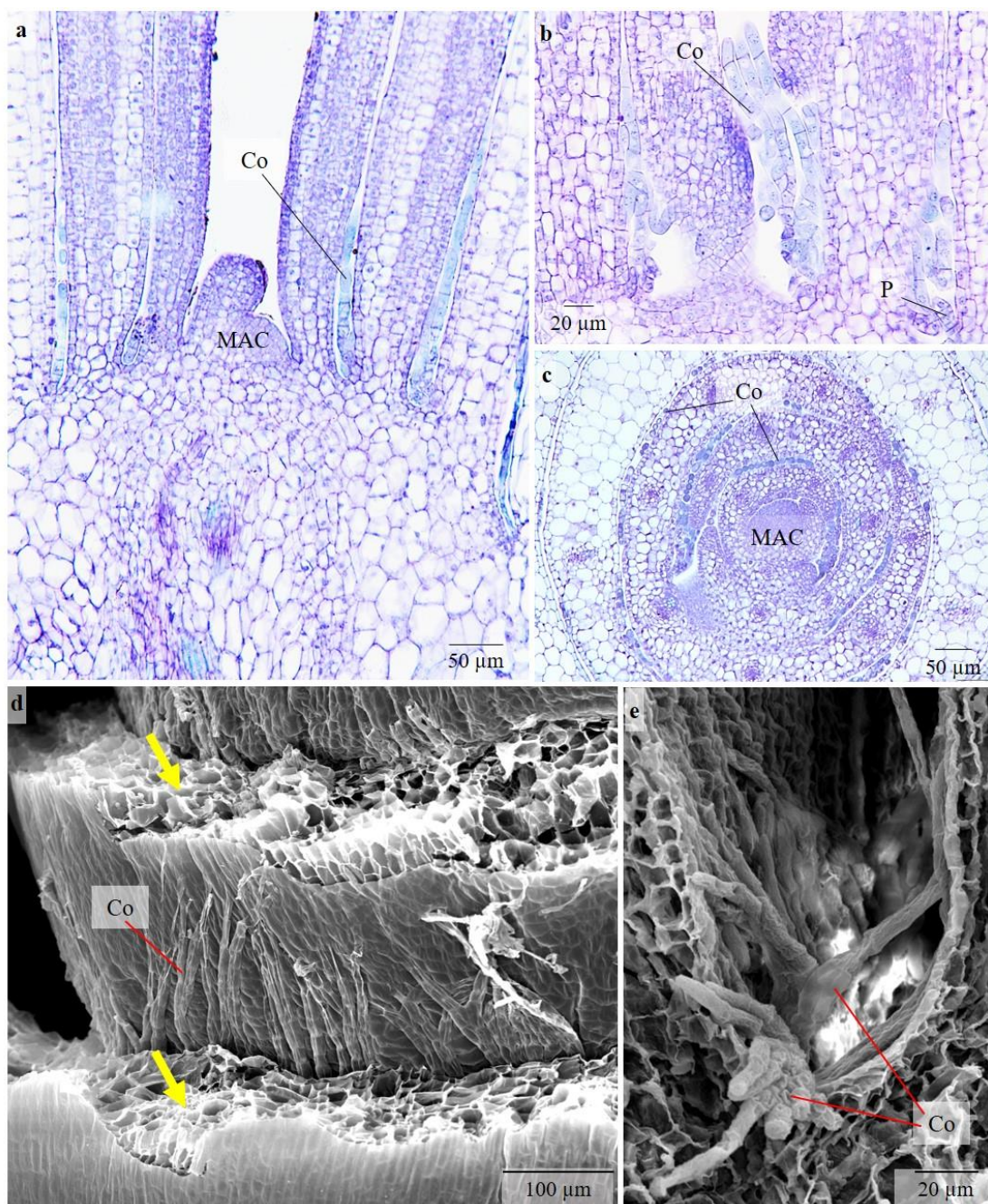


Figura 3: Cortes longitudinais (a, b) e transversal (c) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (d, e) do ápice caulinar mostrando a localização dos coléteres de *Nidularium minutum* cultivada in vitro em meio MS por 90 dias. As setas em d indicam o local da retirada das folhas. Co: coléter; MAC: meristema apical caulinar; P: pedicelo do coléter.



Oliveira (2017) estudou três espécies de *Tillandsia* (*T. recurvata*, *T. tricholepis* e *T. usneoides*) e observou que havia a presença deste tipo de tricomas apenas em *T. tricholepis*. Esta autora identificou a composição mista do exsudato com substâncias lipofílicas, mucilaginosas e proteicas, classificando estes tricomas de glandulares do tipo coléteres. Este tipo de tricoma também foi reportado em *Aechmea blanchetiana* por Ballego-Campos e Paiva (2018) que, além de descreverem a morfologia, também identificaram as organelas envolvidas na função secretora desta estrutura. São poucos os estudos que reportam a presença de coléteres em monocotiledônea. Em Orchidaceae, tricomas glandulares semelhantes foram observados nas axilas foliares dos ápices caulinares tendo como função a secreção de substâncias de proteção contra microrganismos e lubrificação dos órgãos jovens em desenvolvimento (Mayer et al., 2011; Cardoso-Gustavson et al., 2014). No caso de bromélias com tanque, como *N. minutum*, a função destas estruturas ainda deve ser discutida com maior detalhamento por causa da presença de água na região onde se encontram os coléteres. Estudos mais detalhados com testes histoquímicos e microscopia eletrônica de transmissão são importantes para identificar a natureza do exsudato e as organelas responsáveis por secretar tal substância.

O caule de *N. minutum* possui entrenós muito curtos (Fig. 4a, b) e gema na axila das folhas (Fig. 4c). Caule com entrenós longos raramente ocorre em bromélias (Benzing 2000). O fato dessas plantas apresentarem entrenós curtos permite a sobreposição e cobertura completa do caule pelas folhas e a consequente forma de roseta comum nas Bromeliaceae (Krauss, 1948).

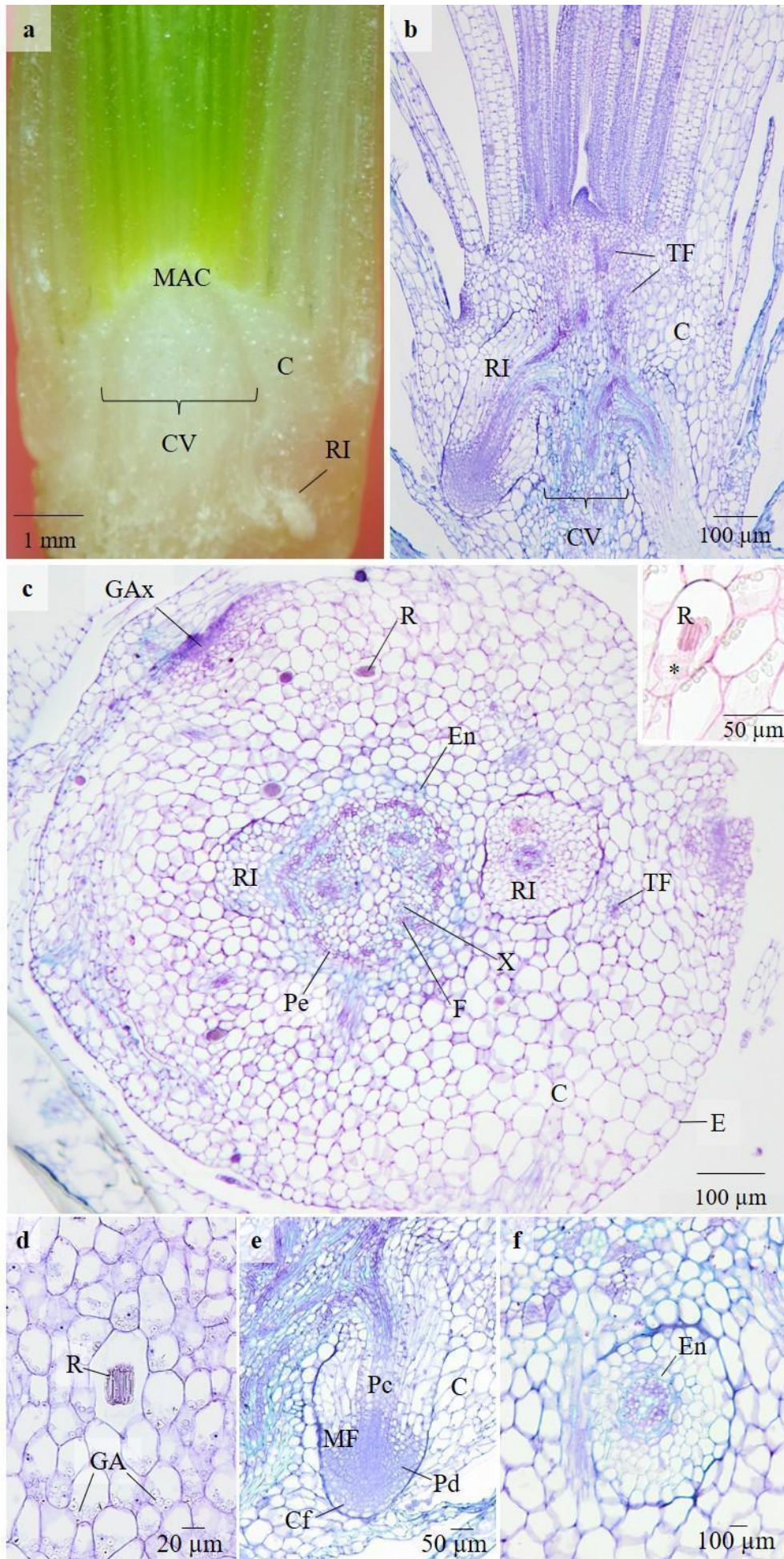


Figura 4: *Nidularium minutum* cultivada in vitro por 90 dias em meio MS. **a** - Corte longitudinal mediano do caule da planta fresca. **b** - Corte longitudinal do caule mostrando as folhas e as raízes intracorticais. **c** - Corte transversal do caule mostrando córtex e cilindro vascular, **inset**: idioblasto com ráfides e mucilagem (\*). **d** - Células do córtex caulinar com grãos de amido e idioblasto com ráfides. **e**, **f** - Cortes longitudinal e transversal da raiz intracortical, respectivamente. C: córtex; Cf: coifa; CV: cilindro vascular; E: epiderme; En: endoderme; F: floema; GA: grãos de amido; GAx: gema axilar; MAC: meristema apical caulinar; RI: raiz intracortical; Pe: periciclo; Pc: procâmbio; Pd: protoderme; R: ráfide; TF: traço foliar; X: xilema.

O caule de *N. minutum* apresenta duas regiões distintas, o córtex e o cilindro vascular (Fig. 4a-c). As células parenquimáticas do córtex são maiores, quando comparadas às células do cilindro vascular e podem conter grãos de amido (Fig 4d). No córtex também há presença de idioblastos com ráfides e mucilagem (Fig. 4c - inset, d). Idioblastos contendo ráfides são comumente encontrados em muitas espécies de bromélias (Kowalski et al., 2021; Dias-Pereira et al., 2022; Elias et al., 2022; Siqueira et al., 2023). Em *N. minutum*, o cilindro vascular é delimitado pela endoderme (Fig 4c). Na parte interna à endoderme está o periciclo que apresenta dois ou três estratos de células, indicando o processo de divisão, que originará novos feixes vasculares (Fig. 4c). Os feixes vasculares presentes no cilindro vascular são do tipo colateral (Fig. 4c). Na base do caule, o cilindro vascular é mais largo e ao longo do cilindro vascular podem ser observadas lacunas deixadas pelos traços foliares (Fig. 4b, c) os quais migram para a região periférica do córtex.

### 3.3 Raízes

Aos 90 dias de cultivo in vitro, a raiz primária de *N. minutum* se encontra em estado de deterioração. Deste modo, em nosso estudo analisamos apenas as raízes adventícias intracorticais. Estas raízes se formam no interior do córtex ao longo de toda a extensão do caule a partir do periciclo (Fig. 4a-c). Em outras espécies de bromélias, diferentemente de *N. minutum*, este tipo de raiz se origina próximo ao ápice caulinar, como observado em algumas espécies do gênero *Tillandsia* e em *Dyckia tuberosa* (Proença e Sajo, 2008). Segundo estas autoras, algumas das raízes intracorticais formadas em Bromeliaceae, ao crescerem e se tornarem externas, alcançam as bainhas das folhas e podem absorver água e nutrientes que ficam retidos nestes espaços.

No ápice das raízes intracorticais de *N. minutum* podem ser observados a coifa e os tecidos meristemáticos primários, ou seja, a protoderme, o procâmbio e o meristema fundamental (Fig. 4e).

A coifa da raiz de *N. minutum* apresenta células grandes em relação às células do meristema apical da raiz. São arredondadas perto do meristema e, à medida que se distanciam, se tornam retangulares (Fig. 4e). As células meristemáticas apresentam organização apical do tipo aberto, ou seja, os três tecidos meristemáticos primários e a coifa têm origem a partir de um grupo de iniciais comuns (Fig. 4e), assim como ocorre em outras espécies de bromélia (Kowalski et al., 2019, 2021).

Na protoderme da raiz de *N. minutum* as divisões celulares são unicamente anticlinais, e após estas células se diferenciarem em epidérmicas, as divisões continuam sendo unicamente anticlinais (Fig. 4e). Já as células do meristema fundamental dividem-se anticlinal e periclinalmente para formação do córtex, constituído por células parenquimáticas (Fig. 4e). No presente estudo não foi observada divisão do córtex em externo e interno. Porém, Carvalho et al. (2017), ao analisarem raízes de *N. minutum* não intracorticais, verificaram que o córtex era diferenciado em córtex externo, constituído por células lignificadas, e córtex interno, composto por células parenquimáticas com grandes espaços intercelulares.

As células mais internas do meristema fundamental da raiz dão origem à endoderme (Fig. 4e). A endoderme das raízes intracorticais de *N. minutum* é unisseriada e as paredes celulares apresentam espessamento em U ou O (Fig. 4f). O cilindro vascular da raiz é triarco com cordões de xilema e floema alternados (Fig. 4f). Não foi constatada presença de medula. No entanto, Carvalho et al. (2017) verificaram que, em raízes não intracorticais de *N. minutum*, o cilindro vascular é poliarco, além de terem observado a presença de medula lignificada.

#### **4 CONCLUSÃO**

Os atributos anatômicos de *N. minutum* que têm como função prevenir a desidratação e a perda excessiva de água pela planta são as folhas com parênquima aquífero e tricomas peltados, coléteres no ápice do caule e raízes intracorticais. Essas características podem facilitar a sobrevivência da bromélia quando ela é transferida do cultivo *in vitro* para o cultivo *ex vitro*.

#### **5 REFERÊNCIAS**

Alves, J.P., Pinheiro, M.V.M., Corrêa, T.R., Alves, G.L., Marinho, T. R.S., Batista, D.S., Campostrini, E. 2022. Morphophysiology of *Ananas comosus* during *in vitro* photomixotrophic growth and *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 59, 106-120.

Ballego-Campos, I., Paiva, E.A.S. 2018. Colleters in the vegetative axis of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae): anatomical, ultrastructural and functional aspects. *Australian Journal of Botany* 66, 379-387.

Ballego-Campos, I., Forzza, R.C., Paiva, E.A.S. 2022. Extranuptial nectaries in bromeliads: a new record for *Pitcairnia burchellii* and perspectives for Bromeliaceae. *The Science of Nature* 109, 1-15.

Barboza, S.B.S.C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, L.A.C. 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 185-194.

Benzing, D.H. 1976. Bromeliad trichomes: structure, function, and ecological significance. *Selbyana* 1, 330-348.

Benzing, D.H. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Bertsouklis, K., Panagaki, K.P. 2022. In vitro germination and propagation of *Dyckia brevifolia*, an ornamental and endangered bromeliad. *Horticulturae* 8, 390.

Campos, A.S., Bomfim, G.V., Azevedo, B.M., Taniguchi, C.A.K., Carvalho, A.C.P.P. 2019. Doses of Osmocote® in the acclimatization of micropropagated plantlets of *Anthurium maricense*. *Revista Agro@ mbiente On-line* 13, 14-23.

Cardoso-Gustavson P., Campbell L.M., Mazzoni-Viveiros S.C., Barros F. 2014. Floral colleters in Pleurothallidinae (Epidendroideae: Orchidaceae). *American Journal of Botany* 101, 587–597.

Carvalho, V. 2022. Tolerância e memória à seca na bromélia epífita *Acanthostachys strobilacea* (Schult. and Schult.f.) Klotzsch. Tese de doutorado, Instituto de Pesquisas Ambientais, São Paulo.

Carvalho, B.D.M., Forzza, R.C. 2022. *Pitcairnia mineira* (Bromeliaceae): A new rheophytic species from the Espinhaço Range, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 36, e2021abb0377.

Carvalho, C.P., Hayashi, A.H., Braga, M.R., Nievola, C.C. 2013. Biochemical and anatomical responses related to the in vitro survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 71, 144-154.

Carvalho, J.L., Hayashi, A.H., Kanashiro, S., Tavares, A.R. 2017. Anatomy and function of the root system of bromeliad *Nidularium minutum*. *Australian Journal of Botany* 65, 550-555.

Dias-Pereira, J., Andrade, G.C., Silva, L.C., Ferrari, F.B., Ribas, R.F., Neto, L.M., Azevedo, A.A. 2022. Leaf structural adaptations in vascular epiphytes from the Atlantic rainforest along phorophyte vertical stratification. *Flora* 288, 152022.

Din, A.F.Z.E., Ibrahim, M.F., Farag, R., El-Gawad, H.G.A., El-Banhawy, A., Alaraidh, I.A., Elbar, O.H.A. 2020. Influence of polyethylene glycol on leaf anatomy, stomatal behavior, water loss, and some physiological traits of date palm plantlets grown in vitro and ex vitro. *Plants* 9, 1440.

Duan, J.X., Duan, Q.X., Zhang, S.F., Cao, Y.M., Yang, C.D., Cai, X.D. 2020. Morphological, physiological, anatomical and histochemical responses of micropropagated plants of *Trichosanthes kirilowii* to hydroponic and soil conditions during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 142, 177-186.

Elias, L., Lima, P.D., Fontes, G.S., Aoyama, E.M. 2022. Influence of luminosity on functional attributes of *Quesnelia quesneliana* (Brongn.) LB Sm. *Hoehnea* 49, e622020-A.

Faria, C.G., Silva, A.S., Melo, R.K.P., Medeiros, A.M.L., Donato, A.M., Costa, A.F., Sá H.B. 2021. Leaf anatomy of *Vriesea* (Tillandsioideae–Bromeliaceae). *Brittonia* 73, 27-52.

Finley, D.S. 1999. Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. *Revista de Biología Tropical* 47: 27-31.

Flores, R., Kraetzig, L.C., Flôres, P.Z., Pereira, D.N., Büneker, H.M., Maldaner, J., Strahl, M.A. 2018. Propagation of *Dyckia vicentensis*, an endemic bromeliad of the Pampa biome, Brazil. *Rodriguésia* 69, 2229-2235.

Franceschi, V.R., Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology* 56, 41.

George E.F., Hall M.A., Klerk G. 2008. *Plant propagation by tissue culture*, 3rd ed. Exegetics, Basingstoke.



Hazarika, B.N., Parthasarathy, V.A., Nagaraju, V. 2001. Influence of in vitro preconditioning of citrus microshoots with paclobutrazol on ex vitro survival. *Acta Botanica Croatica* 60, 25-29.

Horridge, G.A., Tamm, S.L. 1969. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. *Science* 163, 817-818.

Huang, P.L., Liao, L.J., Tsai, C.C., Liu, Z.H. 2011. 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.

Jayaprakash, K., Manokari, M., Cokulraj, M., Dey, A., Faisal, M., Alatar, A.A., Joshee, N., Shekhawat, M.S. 2023. Improved organogenesis and micro-structural traits in micropropagated plantlets of *Caralluma umbellata* Haw. in response to Meta-Topolin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 153, 105-118.

Jensen, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principle and practice*. W.H. Freeman, San Francisco.

Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.

Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27, 137-138.

Kleingesinds, C.K., Gobara, B.N.K., Mancilha, D., Rodrigues, M.A., Demarco, D., Mercier, H. 2018. Impact of tank formation on distribution and cellular organization of trichomes within *Guzmania monostachia* rosette. *Flora* 243, 11-18.

Kowalski, V.K., Tardivo, R.C., Oliveira, F.M.C., Mourão, K.S.M. 2021. Morphology and anatomy of seedlings of Bromeliaceae from the perspective of ecophysiological types. *Flora* 285, 151959.

Kowalski, V.K., Pereira, P.P.D.A., Oliveira, F.M.C.D., Costa, M.E., Tardivo, R.C. 2016. Are the wing's cells alive? Study case in *Vriesea* trichomes. *Rodriguésia* 67, 427-435.

Krauss, B.H. 1948. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr Merr. I. Introduction, organography, the stem, and the lateral branch or axillary buds. *Botanical Gazette* 110, 159-217.

Kurita, F.M.K., Machado, B.D.M., Teixeira, N.B., César, C.D.A., Nievola, C.C., Tamaki, V. 2014. Phenology, in vitro cultivation, and acclimatization of the endangered bromeliad species *Nidularium minutum* Mez. *Biotemas* 27, 59-69.

Leme, E.M.C. 2000. *Nidularium*. Bromélias da Mata Atlântica. Sextante Artes Editora, Rio de Janeiro.

Lima, A.P.P.S., Brito, A.L., Santana, J.R.F.D. 2020. Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. *Ciência Rural*, 50, e20180922.

Lima-Brito, A., Albuquerque, M.M.S., Resende, S.V., Carneiro, C.E., Santana, J.R.F. 2016. Rustificação in vitro em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. *Revista Ciência Agronômica* 47, 152-161.

Louro, R.P., Santiago, L.J.M., Santos, A.V., Machado, R.D. 2003. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* plants cultivated ex vitro in greenhouse and field conditions. *Trees* 17, 11-22.

Malda, G., Suzán, H., Backhaus, R. 1999. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81, 71-87.

Manokari, M., Priyadharshini, S., Shekhawat, M.S. 2021. Microstructural and histochemical variations during in vitro to in vivo plant developments in *Aloe vera* (L.) Burm.f (Xanthorrhoeaceae). *Industrial Crops and Products* 160, 113162.

Martins, J.P.R., Rodrigues, L.C.A., Conde, L.T., Gontijo, A.B.P.L., Falqueto, A.R. 2020. Anatomical and physiological changes of in vitro propagated *Vriesea imperialis* (Bromeliaceae) in the function of sucrose and ventilated containers. *Plant Biosystems* 154, 87-99.

Mayer, J.L.S., Cardoso-Gustavson P., Appezzato-da-Glória B. 2011. Colleters in monocots: new record for Orchidaceae. *Flora* 206, 185-190.

McIlvaine, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry* 49, 183-186.



Ministério do Meio Ambiente (MMA). Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. Disponível em: <https://in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>. Acesso 17 de agosto de 2023.

Monteiro, R.F., Forzza, R., Mantovani, A. 2011. Leaf structure of *Bromelia* and its significance for the evolution of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* 293, 53-64, 2011.

Moyo, M., Aremu, A.O., van Staden, J. 2015. Insights into the multifaceted application of microscopic techniques in plant tissue culture systems. *Planta* 242, 773-790.

Negrelle, R.R.B., Mitchell, D., Anacleto, A. 2012. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. *Acta Scientiarum- Biological Sciences* 34, 91-100.

Nikalje, G.C., Srivastava, A.K., Pandey, G.K., Suprasanna, P. 2018. Halophytes in biosaline agriculture: Mechanism, utilization, and value addition. *Land Degradation & Development* 29, 1081-1095.

Ogburn, R.M., Edwards, E.J. 2010. The ecological water-use strategies of succulent plants. *Advances in Botanical Research* 55, 179-225.

Oliveira, F.M.C. 2017. Contribuições aos estudos anatômicos de Bromeliaceae (Poales) sob uma perspectiva filogenética. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Oliveira, R.S., Souza, S.O., Aona, L.Y.S., Souza, F.V.D., Rossi, M.L., Souza, E.H. 2022. Leaf structure of *Tillandsia* species (Tillandsioideae: Bromeliaceae) by light microscopy and scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique* 85, 253-269.

Ördögh, M. 2022. Morphological, physiological features and differences of *Vriesea splendens* 'Fire' plants during in vitro multiplication and rooting. *International Journal of Horticultural Science* 28, 78-85.

Paiva, E.A.S. 2021. Do calcium oxalate crystals protect against herbivory?. *The Science of Nature* 108, 1-7.

Pereira, A.R., Pereira, T.S., Rodrigues, A.S. Andrade, A.C.S. 2008. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Botanica Brasilica* 22, 1150-1162.

- Pontes, R.A., Santa-Rosa, S., Martinelli, A.P., Versieux, L.M. 2019. A new species of *Araeococcus* (Bromeliaceae) from Bahia, Brazil and a comparative morphological and anatomical analysis. *Systematic Botany* 44, 790-797.
- Proença, S.L., Sajo, M.D.G. 2008. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. *Rodriguésia* 59, 113-128.
- Prychid, C.J. Rudall, P.J. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Annals of Botany* 84,725-739.
- Sakai, W.S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technology* 48, 247-249.
- Segatto, F.B., Bisognin, D.A., Benedetti, M., Costa, L.C., Rampelotto, M.V., Nicoloso, F.T. 2004. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. *Ciência Rural* 34, 1597-1601.
- Shahzad, A., Parveen, S., Sharma, S., Shaheen, A., Saeed, T., Yadav, V., Akhtar R., Ahmad Z., Upadhyay, A. 2017. Plant tissue culture: applications in plant improvement and conservation. In: Abdin M., Kiran, U., Kamaluddin, Ali, A. (Eds.), *Plant Biotechnology: principles and applications*. Springer, Singapore, pp. 37-72.
- Silva, K.R., Versieux, L.M., Oriani, A. 2020a. Morphological and anatomical variations of roots, leaves, peduncles, and peduncle bracts in the *Vriesea oligantha* complex (Bromeliaceae): Perspectives for taxonomy. *Systematic Botany* 45, 779-793.
- Silva, E.C., Sibov, S.T., Santos, F.C.A.D., Gonçalves, L.A. 2020b. Influence of test tube sealing on the morpho-anatomy and ultrastructure of leaves of *Aechmea bromeliifolia* (Bromeliaceae) grown in vitro. *Rodriguésia* 71, e00332018.
- Siqueira, S.F.H., Costa, A.F., Toni, K.L. 2023. Beyond SEM: stigmatic margins in Bromeliaceae. *Flora* 298, 152195.
- Souza, S.D.O., Oliveira, R.S., Souza, F.V., Aona, L.Y.S., Rossi, M.L., Souza, E.H. 2020. Morphoanatomy and stigma receptivity in *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) occurring in Bahia, Brazil. *Nordic Journal of Botany* 38,: e02879.

Suárez, E., Alfayate, C., Pérez-Francés, J.F., Rodríguez-Pérez, J.A. 2019. Structural and ultrastructural differences between field, micropropagated and acclimated leaves and stems of two *Leucospermum* cultivars (Proteaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 136, 15-27.

Teixeira M.G., Nievola C.C. 2023. Differential sprouting ability during micropropagation of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae). *Acta Scientiarum- Biological Sciences* 45, e64678.

Tomlinson P.B. 1969. *Anatomy of the Monocotyledons: Commelinales-Zingiberales*, v. 3. Oxford University Press. Oxford, UK. pp. 192-294.

Zorger, B.B., Arrivabene, H.P., Milanez, C.R.D. 2019. Adaptive morphoanatomy and ecophysiology of *Billbergia euphemiae*, a hemiepiphyte Bromeliaceae. *Rodriguésia* 70, e00592018.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os estudos com a bromélia *Nidularium minutum*, que deram origem a esta tese, revelaram que esta planta possui uma variabilidade genética, pois as respostas a indução de brotação variam muito de indivíduo para indivíduo. Interessantemente, alguns indivíduos desta espécie apresentam brotação in vitro sem a necessidade da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura e os brotos destes indivíduos, após separados da planta mãe e subcultivados, têm tendência a continuar a emitir brotos (Teixeira e Nievola, 2023).

Por meio de análises anatômicas foi possível verificar que os brotos de *N. minutum* cultivada in vitro formam-se a partir da base do caule. No início da diferenciação das células do córtex da região basal do caule há um intumescimento desta região devido a formação de gemas, que futuramente se transformarão em brotos com caules e folhas totalmente diferenciadas.

Todo o processo da brotação está envolvido com uma dinâmica nas atividades das enzimas antioxidantes que são capazes de controlarem as espécies reativa de oxigênio (ROS) e também a peroxidação da membrana celular. Assim, fica claro que o equilíbrio da oxirredução entre ROS e enzimas do sistema antioxidante é fundamental para o desenvolvimento da planta.

Futuros estudos de histoquímica e do conteúdo de ROS nos tecidos de *Nidularium minutum*, métodos usados por Zeng et al. (2017), podem completar o entendimento de como as ROS, controladas pelo sistema antioxidante, determinam o destino das células meristemáticas, definindo brotação in vitro desta bromélia.

## REFERÊNCIAS

Teixeira, M. G.; Nievola, C. C. (2023) Differential sprouting ability during micropropagation of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae). Acta Scientiarum. Biological Sciences. Doi: 10.4025/actascibiolsci.v45i1.64678 (no prelo).

Zeng, J.; Dong Z.; Wu H.; Tian Z.; Zhao, Z. (2017) Redox regulation of plant stem cell fate. EMBO J 36:2844-2855. Doi:10.15252/emj.201695955