

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

TALITHA JOANA KIEVITSBOSCH

**Cultivo *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae
com potencial ornamental**

Piracicaba

2011

TALITHA JOANA KIEVITSBOSCH

**Cultivo *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae
com potencial ornamental**

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Kievitsbosch, Talitha Joana

Cultivo in vitro e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae com potencial ornamental / Talitha Joana Kievitsbosch; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011.

158 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biotecnologia de plantas 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Germinação
4. Materiais de propagação vegetal 5. Morfologia vegetal 6. Nutrição vegetal
7. Plantas ornamentais I. Título

CDU 631.53:582.548.11

Aos meus pais, Paulo e Suzana,
e às minhas irmãs, Thais e Thatiane,
por serem meu porto-seguro, meu exemplo, meu apoio, meu incentivo.
Por todo amor.
Com muito carinho.

DEDICO

Aos meus avós, O. Toon, O. Henk e Oma,
por serem meu orgulho e minha inspiração.
Por todo esse carinho especial.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus...

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli (CENA/USP) pela oportunidade da realização do mestrado, pela confiança em mim depositada e pela ajuda, mesmo que muitas vezes à distância, para a realização deste trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo, processo 2008/07665-0.

Ao Centro de Energia Nuclear da Agricultura (CENA/USP) pela oportunidade de cursar o mestrado em Biologia na Agricultura e Ambiente e por toda a estrutura fornecida para a realização deste trabalho. A todos os funcionários, secretários, bibliotecários, pessoal da oficina, da administração, da faxina, da manutenção, obrigada por permitirem o funcionamento desta estrutura e por estarem sempre dispostos a ajudar e dar suporte aos alunos. Em especial, gostaria de agradecer à Marília Henyei da biblioteca pela atenção e disposição em me ajudar na revisão das referências e formato final de dissertação, à equipe de secretários da pós-graduação e à secretária Suzineide Manesco pelas inúmeras assistências e boa vontade em ajudar.

À Alice Noemi Aranda-Peres por todo o incentivo, conselhos, dicas e amizade, principalmente na fase inicial e mais difícil para mim deste trabalho e pelo fornecimento das sementes e plantas matrizes utilizadas neste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (CENA/USP). Renan, Hilo, Raquel, Rafael, Priscila, Sylvia, Mariana, Tábata, Camila, Karina e Profa. Dra. Neusa Nogueira, muito obrigada por tornarem o meu dia a dia mais divertido. Obrigada pelos conselhos, sugestões, ombros amigos, idéias e críticas. Obrigada por me ajudarem nos experimentos, gráficos, estatística, fotos. Obrigada pela convivência e alegrias divididas. Vocês são demais! Adorei poder fazer parte desta equipe! Juntos somos mais que um.

À Mônica Lanzoni Rossi, o anjo da guarda do laboratório (CENA/USP). MÔ, o que seria desta equipe se não fosse você? Muito obrigada por todos os incentivos, suporte e ensinamentos, sempre. Você é um exemplo de profissional, de amiga, de pessoa. Te admiro por sua dedicação, paciência, altruísmo, força e ânimo. Obrigada por me ajudar com as lindas fotos. Você me ensinou coisas que vão muito além da pesquisa em si. Obrigada por tudo!

Ao pessoal do laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), Renatinha, Marcelo, Aninha, Fabiana, Léo, Alê, Flávia, Eveline. Obrigada pelas conversas, novas idéias, empréstimos, risadas e convivência, principalmente nas horas compartilhadas no fluxo ou fazendo meio de cultura. Obrigada por estarem sempre disponíveis para ajudar.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/USP, ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka pelo suporte e permissão para realização do trabalho de microscopia.

Ao Prof. Dr. José Lavres Júnior e à técnica Cleuza Pereira Cabral, do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (CENA/USP), pela ajuda em todas as etapas da realização do experimento de nutrição mineral. Ao José, obrigada pela paciência e conselhos de grande valia. Também gostaria de agradecer à Aparecida de Fátima Petrezze, do Laboratório de Química Analítica (CENA/USP), pela ajuda na determinação dos teores foliares dos nutrientes.

Ao João Geraldo Brancalion e à Silvana P. Mazieiro da Seção Técnica de Informática (CENA/USP) pela grandiosa ajuda na editoração gráfica durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues (ESALQ/USP) por me atender e se propor a me ajudar quando encontrei dificuldades durante a realização dos experimentos.

À Banca Examinadora pelo aceite do convite.

À minha família. Obrigada pelo apoio, incentivo e confiança quando mais precisei. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos e me ajudarem a vivê-los, sempre acreditando em uma

capacidade que nem eu sabia que tinha dentro de mim. Sempre aprendi muito com vocês e se cheguei até aqui, é porque vocês sempre estiveram comigo. Vocês são meu porto-seguro. Mama, papa, Thais, Thatiane, Opa Henk, Opa Toon, Oma, T. Emily, O. Wessel, Annemieke, Ellen, Samuel, Pedro e Diogo, obrigada por tudo!!

Ao Luís, meu amor, meu companheiro. Obrigada por sempre estar ao meu lado, por me incentivar e sempre me fazer mais e mais feliz. Obrigada por ouvir meus desabafos, e fazer com que cada dificuldade pareça sempre menor, mais fácil de ser superada. Amo você. Obrigada ao Nenê, à Suely, à Fernanda e ao Magno, minha segunda família, pelos bons momentos passados juntos e por todo apoio e amizade e por me fazerem sentir tão bem nessa minha segunda casa.

Aos meus amigos de Holambra, Rio Claro e Piracicaba. Obrigada por todos os momentos de descontração e energias positivas que sempre renovaram minhas forças para continuar. Sem vocês a vida não teria tanta graça.

Obrigada a todos que de alguma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Com certeza, durante esses anos aprendi muita coisa além do que aqui consta. Muita coisa além de resultados e experimentos. Muita coisa que ficará para os outros dias que ainda estão por vir. Obrigada pela ajuda de todos.

“Um mais um é sempre mais que dois.”

Beto Guedes

RESUMO

KIEVITSBOSCH, T. J. **Cultivo *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae com potencial ornamental.** 2011. 153 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

As bromélias são valorizadas por suas características ornamentais, sendo o gênero *Vriesea* representativo neste setor. O aprimoramento de métodos de propagação *in vitro* destas plantas é altamente necessário a fim de suprir as necessidades do mercado, e evitar o extrativismo ilegal. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou aprimorar o protocolo de propagação *in vitro* de espécies do gênero *Vriesea*, bem como aumentar o conhecimento global das espécies em estudo. Para tanto, sementes das espécies *V. carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex* foram submetidas a processos de assepsia e introduzidas *in vitro* sob três temperaturas: 22 °C, 27 °C e 32 °C. Paralelamente, sementes das mesmas espécies foram semeadas em bandejas e mantidas em casa de vegetação. Através da microscopia eletrônica de varredura e ótica foi realizada a descrição morfo-anatômica do desenvolvimento pós-seminal das plântulas das mesmas espécies. Além disso, procurou-se adequar o meio de cultura às necessidades das mesmas espécies e de *V. hieroglyphica*, sendo testadas 3 doses de nitrogênio e 3 doses de magnésio. Também procurou-se avaliar a taxa de sobrevivência durante o processo de aclimatização de plântulas das espécies de *Vriesea* mencionadas (com exceção de *V. hieroglyphica*). Objetivou-se comparar características anatômicas e morfológicas de folhas das referidas espécies cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. Por fim, com o objetivo de estabelecer um protocolo de micropropagação para as espécies *Vriesea carinata*, *V. paraibica*, *V. phillipo-coburgii*; *V. simplex* e *Aechmea nudicaulis*, foram introduzidos *in vitro* explantes somáticos, após testes de assepsia. A partir dos experimentos citados foi verificado que a temperatura exerce uma forte influência nas taxas de germinação e mortalidade das sementes de *Vrieseas in vitro*, sendo que a temperatura de 32°C proporcionou as maiores taxas de mortalidade, mostrando-se prejudicial ao sucesso reprodutivo. A germinação em casa de vegetação apresentou altas taxas de mortalidade e taxas de germinação mais baixas do que *in vitro*. A descrição morfo-anatômica do desenvolvimento pós-seminal permitiu a caracterização de cinco estágios de desenvolvimento. Com relação ao experimento de nutrição mineral, foi evidenciado que as doses de nitrogênio e magnésio testadas acarretaram em menor acúmulo de cálcio e de potássio nas plantas, sendo que esse fato resultou em menor acúmulo de massa fresca. O experimento de aclimatização ficou inviabilizado devido ao ataque às plântulas por praga Fungus Gnats. Com a análise morfo-anatômica das folhas de plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação foi possível observar a presença de estruturas típicas de Bromeliaceae nas plantas cultivadas em ambas as condições: estômatos, tricomas escamiformes, mesofilo com epiderme unisseriada, parênquima aquífero, feixes colaterais fechados e canais de aeração. Com relação à introdução *in vitro* a partir de explantes somáticos, pode-se afirmar que o uso de cefotaxima apresentou uma boa eficiência no combate à contaminação bacteriana em cultura de ápices caulinares. A escolha de ápice vegetativo de brotos laterais como explantes iniciais para a cultura das referidas espécies *in vitro* é uma boa opção. A otimização da propagação destas espécies *in vitro* poderá diminuir a pressão extrativista que estas vêm sofrendo e, ao mesmo tempo, abastecer o mercado ornamental.

Palavras-chave: Bromélia. Germinação. Desenvolvimento pós-seminal. Morfo-anatomia. Nutrição *in vitro*. Ápice caulinar. Microscopia de luz. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

KIEVITSBOSCH, T. J. ***In vitro* culture and post-seminal development of Bromeliaceae with ornamental potential.** 2011. 153 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Bromeliads are valued for their ornamental characteristics and the genus *Vriesea* is representative in this sector. The improvement of *in vitro* propagation of these plants is highly necessary in order to meet market needs, and, at the same time, to prevent illegal extraction of these plants from their natural habitat. In this context, this study aimed to improve the protocol for *in vitro* propagation of species of *Vriesea* and increase the global knowledge of these by morpho-anatomical characterization of the development of the seedling and leaf. Seeds of *V. carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraiba* and *V. simplex* were submitted to aseptic procedures and introduced *in vitro* under three temperatures: 22 °C, 27 °C and 32 °C. Additionally, seeds of these species were sown in trays and maintained in a greenhouse. The post-seminal development was described by light and scanning electron microscopy. In addition, the adjustment of the culture medium for these four species and *V. hieroglyphica* was tested, by testing three doses of nitrogen combined with three doses of magnesium. The acclimatization efficiency of these *Vriesea* species, except for *V. hieroglyphica*, after a prior culture in the presence and absence of IBA was done, in three commercial substrates to verify IBA effect in rooting and seedling survival. This study also aimed to compare anatomical and morphological characteristics of leaves of the species cultivated *in vitro* and in the greenhouse. Finally, in order to establish a micropropagation protocol for the species *Vriesea carinata*, *V. paraiba*, *V. phillipo-coburgii*; *V. simplex* and *Aechmea nudicaulis*, somatic explants were introduced *in vitro* after sterilization tests. From all the experiments cited it was observed that the temperature strongly influences germination and mortality rates of *Vriesea* germinating seeds *in vitro*. The temperature of 32 °C provided the highest mortality rates, being harmful to the reproductive success of this species. The germination in the greenhouse showed higher mortality and lower germination rates than *in vitro* germination. The morpho-anatomical description of the post-seminal development allowed for the characterization of five stages of development. With regard to the mineral nutrition experiment, the doses of nitrogen and magnesium tested resulted in less accumulation of calcium and potassium in plants, resulting in less accumulation of fresh weight. The acclimatization experiment was lost by the attack of Fungus gnats. With the morpho-anatomical analysis of leaves of plants grown *in vitro* and in the greenhouse it was possible to observe the presence of typical structures of Bromeliaceae such as stomata, scales, mesophyll with uniseriate epidermis, water storage tissue, collateral vascular bundles and air channels. Finally, the use of cefotaxime proved efficient against bacterial contamination in *in vitro* establishment of shoot apex explants *in vitro*. The choice of shoot apices from lateral buds as initial explants for *in vitro* establishment of those species was a good alternative. Optimization of *in vitro* propagation of bromeliad species can reduce their extractivism pressure and, at the same time, supply the ornamental plant market.

Keywords: Bromeliad. Germination. Post-seminal development. Morpho-anatomy. *In vitro* nutrition. Shoot apices. Light microscopy. Scanning electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plantas adultas das espécies de Bromeliaceae	51
Figura 2 - Organograma representando os experimentos realizados com <i>Vriesea carinata</i> , <i>V. friburgensis</i> , <i>V. paraibica</i> , <i>V. simplex</i> e <i>V. hieroglyphica</i> a partir de sementes e plântulas provenientes das mesmas	52
Figura 3 - Organograma representando os experimentos realizados com <i>Vriesea carinata</i> , <i>V. paraibica</i> , <i>V. simplex</i> , <i>V. phillipo-coburgii</i> e <i>Aechmea nudicaulis</i> a partir de brotos laterais provenientes das plantas matrizes.....	53
Figura 4 - Bandejas contendo substrato Plantmax ®, em casa de vegetação	54
Figura 5 - Substratos testados no experimento de aclimatização e plântulas transferidas para o processo de aclimatização	62
Figura 6 - Germinação e sobrevivência das sementes de <i>Vriesea carinata</i> , <i>V. friburgensis</i> , <i>V. paraibica</i> e <i>V. simplex</i> mantidas em casa de vegetação.....	67
Figura 7 - Porcentagem de germinação de sementes e de sobrevivência de plântulas <i>in vitro</i>	70
Figura 8 - Semente, germinação e plântula de <i>Vriesea</i> sp <i>in vitro</i>	78
Figura 9 - <i>Vriesea carinata</i> . Vista frontal da morfologia da semente, germinação e planta jovem.....	79
Figura 10 - <i>Vriesea friburgensis</i> . Vista frontal da morfologia da semente, germinação e planta jovem.	80
Figura 11 - <i>Vriesea paraibica</i> . Vista frontal da morfologia da semente, germinação e planta jovem.	81
Figura 12 - <i>Vriesea simplex</i> . Vista frontal da morfologia da semente, germinação e planta jovem.....	82
Figura 13 - Média de três repetições de massa de matéria fresca de plantas provenientes dos diferentes tratamentos para cada espécie.....	86
Figura 14 - Média de três repetições de massa de matéria seca de plantas provenientes dos diferentes tratamentos para cada espécie.....	87
Figura 15 - Produção de massa de matéria fresca de <i>Vriesea carinata</i> em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura.....	88
Figura 16 - Produção de massa de matéria fresca de <i>Vriesea friburgensis</i> em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura.....	89
Figura 17 - Produção de massa de matéria fresca de <i>Vriesea simplex</i> em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura.....	90
Figura 18 - Produção de massa de matéria fresca de <i>Vriesea hieroglyphica</i> em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura..	91

Figura 19 - Produção de massa de matéria seca de <i>Vriesea carinata</i> em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura.....	92
Figura 20 - Plântulas de espécies de <i>Vriesea</i> provenientes de meio de cultura com ou sem AIB, anteriormente à aclimatização	102
Figura 21 -Secções transversais do mesofilo de folhas de <i>Vriesea</i> adultas cultivadas em casa de vegetação e cultivadas <i>in vitro</i>	106
Figura 22 - Detalhes do mesofilo de folhas de <i>Vriesea</i> de plantas adultas cultivadas em casa de vegetação e de plântulas cultivadas <i>in vitro</i>	107
Figura 23 - Morfologia da vista frontal da superfície foliar de plantas de <i>Vriesea</i>	110
Figura 24 - Vista frontal da morfologia de escamas e estômatos da face abaxial de folhas das espécies de <i>Vriesea</i>	111
Figura 25 - Número médio de escamas.mm ² em folhas de espécies de <i>Vriesea</i>	113
Figura 26 - Número médio de estômatos.mm ⁻² em folhas de espécies de <i>Vriesea</i>	114
Figura 27 - Exemplos das características observadas nas culturas de ápices caulinares <i>in vitro</i> de <i>Aechmea nudicaulis</i> e <i>Vriesea</i> spp.	123
Figura 28 - Avaliação das culturas de ápices caulinares de quatro espécies de <i>Vriesea</i> e de <i>A. nudicaulis</i>	123
Figura 29 - Comparação entre a eficiência de regeneração a partir de ápices caulinares de espécie de <i>Vriesea philipo-coburgii</i> e <i>Aechmea nudicaulis</i>	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição mineral do meio de cultura M4.....	59
Tabela 2 - Doses de nitrogênio, magnésio, cobre e ferro utilizadas como alterações propostas ao meio M4 para o cultivo de cinco espécies de <i>Vriesea</i>	59
Tabela 3 - Descrição dos tratamentos preliminares de assepsia em ápices vegetativos de <i>Aechmea nudicaulis</i> cujos resultados implicaram na definição do experimento.....	65
Tabela 4 - Porcentagem de germinação das sementes e mortalidade de plântulas de <i>Vriesea carinata</i> , <i>V. friburgensis</i> , <i>V. paraibica</i> e <i>V. simplex</i> , cultivadas em bandejas com substrato Plantmax® em casa de vegetação aos 120 dias após a semeadura.....	68
Tabela 5 - Porcentagem de germinação de sementes e mortalidade de plântulas de <i>Vriesea carinata</i> , <i>V. friburgensis</i> , <i>V. paraibica</i> e <i>V. simplex</i> , cultivadas <i>in vitro</i> sob diferentes temperaturas durante 56 dias.....	71
Tabela 6 - Teores de nutrientes (mg kg ⁻¹ de matéria seca) em folhas de cinco espécies de <i>Vriesea</i> cultivadas em meio de cultura contendo nove diferentes combinações de doses de nitrogênio e magnésio (em mg L ⁻¹) e dois controles, C1 e C2.....	94
Tabela 7 - Taxa de sobrevivência de plantas de quatro espécies de <i>Vriesea</i> cultivadas <i>in vitro</i> , com passagem ou não por meio de cultura contendo ácido indolbutírico (AIB), 120 dias após a transferência das mesmas para bandejas contendo três tipos de substratos comerciais para aclimatização	103
Tabela 8 - Número médio de escamas/mm ² nas folhas das espécies de <i>Vriesea</i> nas condições <i>in vitro</i> e em casa de vegetação e nas faces abaxial e adaxial.	112
Tabela 9 - Número médio de estômatos/mm ² em folhas de quatro espécies de <i>Vriesea</i> nas condições <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> e nas faces abaxial e adaxial.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2-iP: 2-isopenteniladenina

AIB: ácido indol 3-butírico

ANA: ácido alfa-naftaleno acético

ATP: adenosina trifosfato

B: boro

BA: 6-benziladenina

BAP: 6-benzil amino purina

Ca: cálcio

CAM: Crassulacean Acid Metabolism

Cu: cobre

Fe: ferro

GA₃: ácido giberélico

K: potássio

Kin: cinetina

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

Mg: magnésio

ML: microscopia de luz

Mn: manganês

MS: meio de cultivo com minerais nutrientes de Murashige; Skoog (1962)

N: nitrogênio

P: fósforo

PBZ: paclobutrazol

PGPR: plant growth-promoting rhizobacteria

PVPP: polyvinylpolypyrrolidone

pH: potencial hidrogeniônico

RNA: ácido ribonucléico

RPCP: rhizobacteria promotora de crescimento de plantas

Zn: zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Características gerais e distribuição geográfica da família Bromeliaceae	18
2.2. Importância das bromélias e de sua preservação ecológica	20
2.3. O gênero <i>Vriesea</i>	22
2.4. Propagação de bromélias: sexual e vegetativa (assexual) e a possibilidade de serem realizadas <i>in vitro</i> visando à produção de mudas	24
2.4.1. Propagação sexual.....	26
2.4.2. Propagação vegetativa (assexual)	27
2.4.2.1. Micropropagação: escolha de explantes e dificuldades encontradas	28
2.4.2.1.1. Meios de cultura e nutrição mineral <i>in vitro</i>	33
2.4.2.1.2. Aclimatização e cultivo em casa de vegetação.....	40
2.5. Características morfo-anatômicas de plântulas e folhas	43
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1. Estudos da germinação de sementes de quatro espécies de <i>Vriesea</i> em casa de vegetação e <i>in vitro</i>	54
4.1.1. Material Vegetal	54
4.1.2. Germinação <i>ex vitro</i>	54
4.1.3. Germinação <i>in vitro</i> das sementes de quatro espécies de <i>Vriesea</i>	55
4.1.3.1 Cultivo <i>in vitro</i>	56
4.2. Análise morfoanatômica do desenvolvimento de plântulas de espécies de <i>Vriesea</i>	56
4.2.1 Análises microscópicas	57
4.2.1.1 Microscopia de luz (ML).....	57
4.2.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	58
4.3. Ajuste mineral do meio de cultura.....	58
4.3.1. Material vegetal	58
4.3.2. Meios de cultura.....	58
4.3.3. Massa de matéria fresca e seca	60

4.3.4. Análises químicas	60
4.3.5 Análise estatística	60
4.4. Aclimatização	61
4.4.1. Material vegetal e meios de cultura anteriores à aclimatização	61
4.4.2. Transferência das plântulas para bandejas	61
4.4.3. Análise estatística	62
4.5. Análise morfo-anatômica de folhas de <i>Vriesea</i>	63
4.5.1. Material Vegetal	63
4.5.2. Determinação do número de estômatos e escamas (tricomas escamiformes).....	63
4.6. Introdução <i>in vitro</i> de espécies de Bromeliaceae a partir de ápices caulinares.....	63
4.6.1. Material vegetal	63
4.6.2. Assepsia e introdução <i>in vitro</i>	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1. Estudos da germinação de sementes de quatro espécies de <i>Vriesea ex vitro</i> e <i>in vitro</i>	67
5.1.1. Germinação de sementes de quatro espécies de <i>Vriesea</i> em casa de vegetação.....	67
5.1.2. Germinação <i>in vitro</i> de sementes de quatro espécies de <i>Vriesea</i>	69
5.2. Análise morfoanatômica do desenvolvimento de plântulas de espécies de <i>Vriesea</i>	76
5.3. Ajuste mineral do meio de cultura.....	86
5.4. Aclimatização	102
5.5. Análise morfo-anatômica de folhas de quatro espécies de <i>Vriesea</i>	105
5.6. Introdução <i>in vitro</i> das espécies a partir de ápices caulinares	122
6. CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS	132

1. INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é composta por cerca de 3090 espécies. Destas, estima-se que 40% encontram-se no Brasil e 21% são endêmicas do domínio da Mata Atlântica (WANDERLEY et al., 2006; MARTINELLI et al., 2008), sendo que a destruição deste habitat é um dos maiores problemas na conservação destas espécies. A maioria dos representantes da família é caracterizada pela forma de vida epífita, embora existam também representantes terrestres e rupícolas (MARTINELLI et al., 2008). Em muitas plantas desta família, a disposição das folhas forma um tanque, no qual se acumulam água e detritos que contribuem para a nutrição da planta (BENZING, 2000; YANOVIK; NADKARNI; GERING, 2003).

As bromélias, devido às suas inflorescências vistosas, com variada combinação de cores, formas e tamanhos e folhagens atrativas, são muito requisitadas do ponto de vista ornamental (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006), como é o caso das plantas do gênero *Vriesea*, objeto de estudo do presente trabalho. Em seu ambiente natural, as bromélias servem de habitat para membros da flora e fauna, sítios de reprodução para animais, e são componentes da biodiversidade do ambiente (BENNET, 2000).

Muitas vezes, as plantas são retiradas ilegalmente de seu habitat natural, na forma de extrativismo indiscriminado, com objetivos de comercialização. Ademais, as *Vrieseas* são plantas de desenvolvimento ontogenético lento, com ciclo de vida longo. Nesse contexto, muitas espécies deste gênero, bem como dos demais, encontram-se em alguma das listas oficiais de espécies ameaçadas. Dentre as espécies registradas na mata Atlântica, 40% encontram-se com algum grau de ameaça à extinção (MARTINELLI et al., 2008).

Naturalmente, as bromélias se propagam sexualmente, através da fecundação e posterior desenvolvimento do embrião, e assexuadamente, com a emissão de brotos laterais que são formados a partir de gemas axilares (DAQUINTA; GUERRA, 1999; ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). A propagação natural, no entanto, não supre as necessidades do mercado de plantas ornamentais, uma vez que a emissão de brotos laterais é lenta e poucos brotos são emitidos. Por outro lado, as sementes possuem baixo sucesso de germinação e o estado juvenil das plantas é longo (MERCIER; KERBAUY, 1995; CARNEIRO et al., 1999).

Considerando esse contexto, a produção de mudas para atender o mercado é uma estratégia importante para minimizar as atividades extrativistas. Estudos relacionados ao sistema de propagação dessas espécies são necessários, a fim de subsidiar o estabelecimento de protocolos eficientes e que possam garantir a produção em larga escala desses materiais. Assim, uma alternativa para a produção comercial de bromélias, bem como para sua conservação, é a propagação *in vitro* (POMPELLI; GUERRA, 2005). Esta estratégia tem demonstrado grandes vantagens em relação às técnicas de propagação tradicionais, pois permite a rápida multiplicação, demandando espaço físico pequeno e permitindo a obtenção de mudas de alta qualidade fitossanitária (GUERRA et al., 1999).

O estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação envolve vários fatores. A escolha do explante é um aspecto muito importante, pois vai determinar o sucesso da propagação *in vitro*, bem como a fidelidade genética das plantas produzidas (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). Sementes permitem a manutenção da variabilidade genética, a qual é importante quando o objetivo é a conservação e/ou o estabelecimento de bancos de germoplasma *in vitro*. Por outro lado, explantes oriundos de células somáticas permitem a obtenção de plantas idênticas à planta matriz, o que é interessante para fins de comercialização.

O método de assepsia do explante é determinante para o sucesso da propagação *in vitro*, uma vez que o estabelecimento do cultivo deve ser livre de microrganismos e de oxidação dos explantes.

O meio de cultura e sua composição mineral desempenham um papel importante no crescimento e desenvolvimento da planta, sendo que cada espécie possui suas próprias exigências nutricionais, de modo que o meio de cultura deve ser adequado à espécie a ser propagada.

A etapa final do cultivo *in vitro* é a aclimatização, uma fase crítica e, muitas vezes, um fator limitante do processo de micropropagação, sendo importante na formação de mudas de qualidade (BANDEIRA et al., 2007).

Avanços no conhecimento da biologia de Bromeliaceae, bem como estudos fisiológicos e de reprodução e propagação são de extrema importância para o melhor aproveitamento dessas espécies, tanto para fins ornamentais quanto para fins de conservação.

O conhecimento da morfologia das sementes e do desenvolvimento pós-seminal, por exemplo, contribui para auxiliar análises de germinação e conservação de sementes (ANDRADE et al., 2003), além de contribuir para um maior conhecimento da espécie

(PAOLI; BIANCONI, 2008), sendo que a emergência e o estabelecimento das plântulas são fases críticas no ciclo de vida das plantas (MELO et al., 2004). A caracterização da morfologia e anatomia da folha contribui na taxonomia das plantas e para compreensão de estratégias adaptativas (SILVA, 2009). A comparação destas características em folhas de plantas provenientes da propagação *in vitro* e de plantas cultivadas em casa de vegetação auxiliam no aperfeiçoamento do protocolo de propagação das mesmas, bem como proporcionam conhecimento sobre a plasticidade fenotípica das plantas (BARBOZA et al., 2006).

Tendo em vista esse contexto, os objetivos gerais deste trabalho foram otimizar o protocolo de micropropagação e ampliar o conhecimento de espécies de Bromeliaceae com elevado potencial ornamental tanto para o mercado interno, como externo, assim como de importância fundamental aos ecossistemas tropicais, para assim fornecer subsídios para a produção em larga escala das mesmas e, ao mesmo tempo, dar suporte a técnicas de conservação *in vitro* de genótipos ameaçados desta família. As espécies utilizadas foram *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica*, *V. simplex*, *V. phillip-coburgii* e *Aechmea nudicaulis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais e distribuição geográfica da família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae contém 58 gêneros e cerca de 3090 espécies (WANDERLEY et al., 2006), todas elas nativas das Américas, com exceção de *Pitcairnia feliciana*, nativa da África (BENZING, 2000). Três centros de diversidade da família Bromeliaceae podem ser reconhecidos: o leste do Brasil nos domínios da Mata Atlântica, o Escudo das Guianas e os Andes (SMITH; DOWNS, 1977). Estima-se que cerca de 40% das espécies, 1200 espécies pertencentes a 40 gêneros, estão distribuídas no Brasil, muitas das quais são endêmicas e concentradas principalmente no bioma da Mata Atlântica (SOUZA; LORENZI, 2005; WANDERLEY et al., 2006). Segundo Martinelli et al. (2008), no domínio da Mata Atlântica são registrados 31 gêneros e 803 espécies sendo que 653 espécies pertencentes a dez gêneros, *Andrea*, *Canistropsis*, *Canistrum*, *Edmundoa*, *Fernseea*, *Lymania*, *Nidularium*, *Portea*, *Quesnelia* e *Wittrockia*, são endêmicos deste domínio.

As bromélias são monocotiledôneas exóticas, de natureza xerófita e classificadas como monocárpicas perenes (CÂNDIDO, 1995) com flores geralmente bissexuais. As bromélias florescem apenas uma vez em seu ciclo de vida e geralmente produzem ramos laterais após o florescimento (BENZING; BURT, 1970).

A família Bromeliaceae é subdividida em três subfamílias: **1) Pitcairnioideae**, que é composta principalmente pelas espécies terrestres com um extenso sistema radicular para absorção de água e nutrientes, folhas em roseta e que não formam um tanque (BENZING; BURT, 1970). Suas folhas apresentam espinhos, produzem sementes pequenas, sem asas, sendo seus frutos classificados como cápsulas secas. Esta sub-família é composta por 16 gêneros e 750 espécies (RUNDEL; DILLON, 1998); **2) Tillandsioideae**, composta por plantas de hábito geralmente epífita e que se caracterizam por possuírem folhas de margens inteiras, sem espinhos e cujo arranjo forma um tanque, tricomas peltados organizados radialmente, ovário geralmente súpero e cápsulas secas tri-partidas contendo sementes com apêndices plumosos que se dispersam pelo vento (FISCHER; ARAÚJO, 1995; BENZING, 2000). A morfologia do estigma é variável dentro desta sub-família com ao menos cinco tipos diferentes, bem como a morfologia polínica, sendo os grãos em sua maioria sulcados, com uma região de

germinação distal. Esta sub-família contém 9 gêneros, incluindo os mais comuns para propósitos comerciais e ornamentais, *Vriesea* e *Guzmania*, e com 810 espécies segundo Rundel e Dillon (1998) e **3) Bromelioideae**, que inclui 31 gêneros e o menor número de espécies, 536 espécies de acordo com Fischer e Araújo (1995). A maioria é epífita, com folhas em roseta, formando tanques que acumulam água e detritos. Em geral têm folhas com espinhos e frutos tipo grão. As sementes são dispersas por animais.

Mais recentemente, Givinish et al. (2007), com base em análises moleculares baseadas na variação nucleotídica de *ndhF*, um gene relativamente grande no genoma do cloroplasto, propuseram uma nova divisão para a família. Nesta proposta Bromeliaceae passa a ter oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae. Resultados obtidos por Givinish et al. (2011) confirmam que a divisão tradicional da família Bromeliaceae em três sub-famílias deve ser abandonada.

A família contém uma rica variedade de formas de vida: terrestre, tanque em forma de roseta e epífita extrema, sendo que mais de 50% das espécies de Bromeliaceae são epífitas (MARTINELLI et al., 2008).

A transição evolucionária de formas terrestres para epífitas está, aparentemente, ligada à formação dos tricomas especializados que recobrem densamente superfícies foliares. Estas estruturas têm como função refletir o excesso de luminosidade e retardar a transpiração, reduzindo o calor e as injúrias causadas pelo sol nas três subfamílias. Principalmente em Tillandsioideae, as células vivas do pedículo que apresentam protoplastos ricos em organelas, permitem a absorção de água e íons nutritivos (BENZING, 1990; 2000). Além disso, os tricomas peltados podem servir de proteção contra patógenos e predadores, por cobrirem a superfície foliar mais delgada (BENZING, 2000). Esta estratégia é uma adaptação fundamental ao ambiente epifítico das bromélias. Em adição às especializações morfológicas, ou seja, corpo de tamanho reduzido e herbáceo, hábito rizomatoso, caule fitotelmico, suculência, além de diversos mecanismos de polinização e dispersão de sementes para adaptação em diferentes habitats (BENZING, 2000) e redução do sistema radicular (MOLLO, 2009), o fator chave para a adaptação de bromélias a ambientes áridos é o seu metabolismo CAM (Crassulacean Acid Metabolism) (CRAYN; SMITH, 2004). Este tipo de metabolismo é eficiente para economia de água uma vez que os estômatos abrem-se somente a noite. Por consequência a esse fato, a taxa de fotossíntese é limitada e o crescimento das bromélias é bastante lento (MAJEROWICZ, 2004). A importante variabilidade das espécies, com diferentes

características fisiológicas, de desenvolvimento e de crescimento permitem inclusive, às bromélias, sua adaptação a ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes e suprimento irregular de água (BENZING, 2000).

2.2. Importância das bromélias e de sua preservação ecológica

As bromélias são valorizadas por suas características ornamentais e potencial comercial. A folhagem atrativa, formas características, brácteas florais coloridas e brilhantes (apesar das flores serem pequenas e efêmeras) e inflorescências terminais são responsáveis pela sua beleza. As bromélias se adaptam facilmente ao cultivo em ambientes internos em climas temperados, requerendo poucas práticas de manutenção (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). O uso de bromélias como plantas ornamentais teve início na década de setenta, quando uma bromélia nativa do Rio de Janeiro, a *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, despertou o interesse comercial e curiosidade por compradores de plantas (MURARO, 2006). Segundo Noventa (2011) em reportagem ao jornal Folha de São Paulo, o mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil já movimentava US\$ 1,1 bilhão por ano e possui crescimento anual contínuo, sendo que no Estado de São Paulo concentram-se cerca de 90% das atividades ligadas a esse setor.

Além de suas características ornamentais, as bromélias desempenham um importante papel ecológico nos ecossistemas naturais. Epífitas desempenham um papel fundamental no ciclo de nutrientes e de água (COXSON; NADKARNI, 1995), sendo componentes essenciais da biodiversidade de florestas tropicais. Bromélias formadoras de tanque pela disposição de suas folhas se constituem em habitat para membros da fauna (YANOVIK; NADKARNI; GERING, 2003) e servem de fonte de água para animais e pássaros (PIZO, 1994).

A família Bromeliaceae contém outras espécies de importância para uso humano. Dentre essas podemos citar o uso de representantes da família na produção de fibras, na alimentação humana e animal, como combustível e para fins medicinais (BENNET, 2000). A categoria de bromélias utilizadas para fibras inclui 13 espécies que provêm roupas, papel, cordas e fios podendo-se destacar, *Aechmea magdalenae*, *Ananas comosus*, *Neoglaziovia variegata*, espécie brasileira que fornece o produto comercial chamado de caroá e *Tillandsia usneoides*. Na alimentação humana, o abacaxi (*Ananas comosus*) é o representante da família mais popular, mas existem ao menos outras 25 espécies que produzem frutas e folhas comestíveis. Por exemplo, bebidas fermentadas, ou não, são

produzidas a partir de *Aechmea magdalenae*, *Bromelia alsodes*, *Bromelia hemisphaerica*, *Bromelia pinguin*, entre outras. Bases de folhas de *Puya sodiroana* são comestíveis, bem como inflorescências contendo alto teor de açúcar de *Tillandsia erubescens* e *T. recurvata*, no México e ápices caulinares de *T. maxima* e *T. rubella* na Bolívia e Argentina. Já na alimentação animal, cerca de 21 espécies de Bromeliaceae são representativas, como é o caso de *Aechmea tessmannii* e *Guzmania acuminata*, entre outras, cuja água acumulada no tanque e inflorescências jovens são utilizadas por espécies de macacos (BENNET, 2000). Além disso, vários representantes de espécies epífitas servem de habitat para membros da fauna, como anfíbios, aranhas e insetos. Várias espécies de *Tillandsia* e *Puya* servem como combustível nos Andes, Peru e Equador, através da queima de bases foliares e ramos.

Cerca de 25 espécies da família apresentam uso medicinal, sendo que a subfamília Bromelioideae possui o maior número de representantes (BENNET, 2000). Por exemplo, a água do tanque ou fitotelmo, de *Aechmea bracteata* é utilizada para curar febre, dor de cabeça e azia no México (BENNET, 2000). *Ananas comosus* e *Bromelia pinguin* possuem propriedades terapêuticas pela presença de uma enzima proteolítica similar à papaína, chamada de bromelina, sendo utilizadas para tratar dores, inflamações, bronquites, parasitas intestinais e reumatismo (BENNET, 2000). Folhas jovens de *Bromelia alsodes* são utilizadas para curar ossos quebrados (BENNET, 2000). Extrato de folhas de *Nidularium procerum* mostrou efeito analgésico e anti-inflamatório (AMENDOEIRA et al., 2005a) e antialérgico (VIERA DE ABREU et al., 2005) quando administrado a ratos. Da sub família Tillandsioideae podem ser citadas as espécies *Guzmania monostachia*, cujas inflorescências são utilizadas no preparo de suco para aliviar dores de ouvido e *Tillandsia benthamiana*, com a qual é preparada uma infusão para curar anemia ou problemas renais (BENNET, 2000).

As bromélias, epífitas em sua maioria, dependem da conservação da floresta. O processo de devastação do bioma da Mata Atlântica é a principal causa da erosão genética de espécies de bromélias (POMPELLI; GUERRA, 2004). Apenas 7,5% da Mata são mantidos em forma de fragmentos dispersos nos seus ecossistemas associados (COFFANI NUNES, 2002, POMPELLI; GUERRA, 2005; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2008). As bromélias são ainda consideradas indicadores ambientais, uma vez que são as primeiras a serem afetadas pela degradação ambiental e desflorestamento e as últimas a se instalarem em áreas de recuperação (MOREIRA, 2008).

Além disso, nos anos entre 1940 e 1950, muitas bromélias foram destruídas por ordem do governo, cujo objetivo era controlar o mosquito transmissor da malária do gênero *Anopheles*, o que acarretou em drástica redução populacional destas plantas. No ano de 2000, a cena se repetiu com o aumento nos casos de dengue, como tentativa de controlar a população de larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Uma vez que estas se desenvolvem apenas em água limpa, trata-se de uma decisão equivocada já que a água acumulada no tanque das bromélias contém também matéria orgânica em decomposição (CARVALHO, 2002).

Ainda, entre as populações de plantas que primeiro sofreram extrativismo ilegal, encontram-se o pau-brasil, as orquídeas e as bromélias, muito procuradas para fins ornamentais (ANACLETO et al., 2006). Dados recentes do extrativismo de bromélias no estado do Paraná, por exemplo, em levantamento realizado por Anacleto et al. (2006), revelam que já há uma tendência na diminuição desta extração ilegal das plantas. Os autores, com base em estudos anteriores concluíram que no ano de 2001 foram retiradas ilegalmente 150.000 plantas. No ano de 2004, esse número caiu para 42.000 e em 2006 para 17.500. Entretanto, apesar dessa queda no extrativismo, é preciso levar em conta que muitas espécies são endêmicas, e esse extrativismo, somado à destruição e fragmentação do habitat destas plantas e ao seu crescimento e desenvolvimento ontogenético lento inerente à família (HOSOKI; ASAHIRA, 1980), pode reduzir drasticamente a diversidade genética da população, conduzindo muitas espécies à ameaça de extinção (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006; WANDERLEY et al., 2006).

Em levantamento de bromélias existentes na Mata Atlântica brasileira realizado por Martinelli et al. (2008), dos 953 táxons registrados, 338 encontram-se citados em alguma das listas oficiais de espécies ameaçadas. Isto significa, que dentre as espécies registradas na mata Atlântica, 40% encontram-se com algum grau de ameaça à extinção.

2.3. O gênero *Vriesea*

O gênero *Vriesea* Lindl, objeto de estudo deste trabalho, foi reconhecido por botânicos em 1843, recebendo esse nome em homenagem a um botânico holandês, H. de Vries. Entretanto, mesmo antes desta data, algumas *Vrieseas* foram introduzidas na Europa, como por exemplo, *V. splendens*, cuja entrada neste continente data de 1840 (BROMELIADS SOCIETY OF QUEENSLAND, 2006). *Vriesea* é o segundo maior

gênero da sub-família Tillandsioideae e o terceiro maior na família Bromeliaceae (BENZING, 2000), sendo o mais utilizado para produção de híbridos e o mais cultivado. As plantas são de tamanho variável e a maioria é epífita, com folhas pêndulas ou firmes, verdes inteiras ou com manchas, densa ou esparsamente cobertas por tricomas (COSTA, 2002). As inflorescências são duradouras e possuem flores amarelas, verdes ou brancas e brácteas coloridas e brilhantes. As inflorescências podem ser em forma de espiga, curvadas ou pêndulas. Plantas deste gênero sofrem fortes injúrias em baixas temperaturas (BLACK; DEHGAN, 2003). São plantas monocárpicas e que se reproduzem vegetativamente por brotos imbricados nas bainhas foliares, brotos externos às rosetas ou, ainda, por estolões que afastam o broto da planta-mãe. Podem se apresentar como indivíduos isolados ou em touceiras (COSTA, 2002).

O gênero é composto por cerca de 250 espécies (BENZING, 2000; WANDERLEY et al., 2006) divididas em duas seções: *Vriesea* e *Xiphion* (COSTA et al., 2009). *Vriesea* seção *Vriesea* inclui espécies com inflorescências simples e compostas com brácteas florais infladas, não involutas alaranjadas ou amareladas e estames exsertos. A seção *Xiphion* inclui espécies com brácteas florais esverdeadas ou amarronzadas e estames inclusos na corola (BENNET, 2000).

O gênero possui dois centros de dispersão: o primeiro no leste do Brasil e o segundo no norte da América do Sul, América Central e Caribe. As espécies ocorrem preferencialmente em ambiente mesofito, sendo também comuns em ambientes abertos como os campos rupestres e campos de altitude (COSTA et al., 2009). Das espécies do gênero *Vriesea*, 166 encontram-se na Mata Atlântica e 145 são endêmicas da Mata Atlântica brasileira (MARTINELLI et al., 2008).

O gênero *Vriesea*, possui representantes ao longo de todo o domínio da Mata Atlântica, sendo que sua maior diversidade é encontrada entre a Bahia e Santa Catarina, incluindo Minas Gerais, com destaque para Rio de Janeiro onde ocorrem 93 espécies (MARTINELLI et al., 2008).

As espécies deste gênero são perenes, herbáceas e com folhas arranjadas em rosetas que absorvem água e nutrientes. São espécies de crescimento lento (STRINGHETA et al., 2005) e se enquadram nos tipos ecológicos I, IV e V (BENZING, 2000), sendo, em sua maioria, epífitas ocorrendo em ambientes sombreados (MARTINELLI et al., 2008). O tipo I se caracteriza por espécies contendo raízes absortivas no solo, sem fitotelmo, tricomas foliares não absortivos, metabolismo fotossintético C3 ou CAM e hábito terrestre. As espécies do tipo IV se caracterizam por

apresentarem raízes mecânicas ou absortivas quando necessário, fitotelmo bem desenvolvido, tricomas foliares absortivos na base das folhas, metabolismo fotossintético em sua maioria C3 e hábito principalmente epífita. Por fim, os indivíduos do tipo V possuem raízes mecânicas ou ausentes, não possuem fitotelmo e são de tamanho reduzido, tricomas absortivos por toda a superfície foliar, metabolismo CAM e hábito saxícola ou epífita. Como exemplo, as espécies *V. carinata* e *V. simplex* se enquadram no tipo IV, possuindo escamas esparsas nas folhas. A última apresenta metabolismo C3 (BENZING, 2000).

Muitas *Vrieseas* são cultivadas para o comércio devido às inflorescências e menos pela folhagem. Estas são chamadas de “*Vrieseas* de folhagem verde” (BROMELIADS SOCIETY OF QUEENSLAND, 2006). As inflorescências são duráveis, sendo que as plantas podem ser mantidas em ambientes internos por longos períodos. Estas variam em forma, podendo ser em forma de espiga ereta e achatada ou pendente e tem como colorações mais comuns das brácteas o amarelo, laranja e vermelho (O JARDINEIRO, 2008). As que são cultivadas e comercializadas pela beleza das folhas são chamadas de “*Vrieseas* com folhagem”. *V. carinata* se engloba no grupo das que se destacam pela inflorescência, possuindo folhas verde-claro que formam uma roseta. Esta espécie foi umas das primeiras a ser comercializada, sendo também muito utilizada para a produção de híbridos (BROMELIADS SOCIETY OF QUEENSLAND, 2006).

2.4. Propagação de bromélias: sexual e vegetativa (assexual) e a possibilidade de serem realizadas *in vitro* visando à produção de mudas

Em condições naturais, as bromélias se propagam sexualmente, através da fecundação e formação de sementes e assexualmente, pela emissão de brotos laterais pela planta-mãe. (DAQUINTA; GUERRA, 1999; ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

A reprodução assexual, pela emissão de brotos laterais, pode ocorrer em plantas de idades variadas, não se restringindo somente a plantas adultas e nem todas as plantas adultas apresentam esta forma de reprodução (BENZING, 2000).

A propagação sexual, por sua vez, é a que se dá a partir da fecundação e posterior desenvolvimento do embrião e semente. A germinação de sementes e seu desenvolvimento são aspectos cruciais para a manutenção da diversidade genética das plantas no seu habitat natural sendo também utilizada na produção de plantas para o comércio (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Para fins comerciais, a propagação vegetativa natural das bromélias, pela emissão de brotos laterais, é bastante lenta, pelo pequeno número de brotos emitidos pelas plantas adultas após o florescimento (MERCIER; KERBAUY, 1995; CARNEIRO et al., 1999). A propagação sexual, por sua vez, também não supre a necessidade da produção comercial destas plantas, uma vez que o sucesso de germinação em geral é baixo (MERCIER; KERBAUY, 1995), e o estado juvenil da planta é bastante longo (HOSOKI; ASAHIRA, 1980).

Esse contexto se aplica também às bromélias do gênero *Vriesea*, objeto de estudo deste trabalho. Várias espécies deste gênero, como *V. gigantea* e *V. philippocoburgii* e outras, produzem sementes com baixa capacidade germinativa (MERCIER; KERBAUY, 1995) e, depois do florescimento, somente um ou dois brotos laterais, de desenvolvimento lento, são formados. Assim, os métodos convencionais de propagação não suprem as necessidades do mercado e, dentro desse contexto, essas bromélias são intensamente coletadas do seu habitat natural (DROSTE et al., 2005). Assim, as técnicas de multiplicação *in vitro* se apresentam como uma boa alternativa para a propagação destas plantas (POMPELLI; GUERRA, 2005) e produção de mudas em larga escala.

Os processos de cultura de tecidos vegetais *in vitro* compreendem um conjunto de técnicas, nas quais um explante (células, tecido ou um órgão) é cultivado sob condições assépticas em meio nutritivo. Este processo se baseia na totipotencialidade das células, ou seja, na capacidade de qualquer célula do organismo vegetal apresentar todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

As técnicas de propagação *in vitro*, se conduzidas corretamente, permitem a obtenção de plantas saudáveis e de alta qualidade independentemente de fatores climáticos limitantes, demandando um espaço físico pequeno e período reduzido (GUERRA et al., 1999). A micropropagação apresenta muitas vantagens como alta taxa de multiplicação, uniformidade fisiológica do material, disponibilidade de propágulos livres de doenças durante o ano inteiro, uniformidade nas brotações, entre outras (ARIAS, 1992).

O sistema padrão de micropropagação, segundo Grattapaglia e Machado (1998), baseia-se em três estágios: 1) seleção dos explantes, a desinfestação e a cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; 2) multiplicação dos propágulos sob sucessivas subculturas em meio adequado; 3) transferência dos explantes para meio de enraizamento e subsequente aclimatização.

2.4.1. Propagação sexual

A propagação sexuada apresenta algumas dificuldades, sendo uma delas a disponibilidade limitada de sementes (DAQUINTA; GUERRA, 1999). Além disso, no caso das bromélias, a germinação pode ser outro fator limitante. Em *Tillandsioideae* e *Pitcairnioideae*, a germinação é mais lenta do que em *Bromelioideae* (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006), sendo que apenas a maturação das sementes pode levar até um ano após a polinização, dependendo da espécie (STRINGHETA et al., 2005). Muitas espécies podem ainda apresentar sementes em dormência e germinação desuniforme e irregular, prejudicando os procedimentos para sua produção (SANTOS et al., 2008).

A temperatura e a luz são os principais fatores ambientais que afetam a germinação de sementes, desde que haja disponibilidade de água e oxigênio. Para muitas espécies vegetais, quando são fornecidas condições adequadas de luz e umidade, a temperatura predominante determina não só a fração de sementes que germina como também a velocidade de germinação (ANDRADE, 1995). Em condições *ex vitro*, então, sementes com ampla capacidade de resposta a condições edafoclimáticas são as responsáveis por manter populações em ambientes extremos ou que apresente algum fator estressante (GAFF, 1987). Os dados de temperaturas cardeais da germinação de sementes podem contribuir para explicar muitas peculiaridades biogeográficas de espécies neotrópicas (BORGHETTI, 2005).

A germinação de sementes *in vitro* é mais rápida e mais eficiente quando comparada com o ambiente natural (MERCIER; KERBAUY, 1995), desde que sejam definidas as condições ideais de cultivo.

Carneiro et al. (1999) conseguiram boas taxas de germinação de sementes de *Neoregelia cruenta* *in vitro* em meio com sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 3% de sacarose. Pickens et al. (2003) trabalharam com germinação e mudas de *Tillandsia eizii*. Para tal espécie, os melhores resultados para germinação foram obtidos a 22°C e com fotoperíodo de 16 horas.

Aranda-Peres (2005) obteve bons resultados na germinação de *Aechmea* em condições *in vitro*, enquanto espécies *Tillandsioideae* (*Vriesea* e *Racinaea*) mostraram taxas de germinação muito baixas. Sementes de *Aechmea bromelifolia* e *A. distichantha* germinaram bem em meios de cultura sem reguladores de crescimento. A adição de GA₃

(ácido giberélico) no meio foi testada para *Vriesea friburgensis*, *V. hieroglyphica*, *V. incurvata*, *V. unilateralis* e *Racinaeae* sendo que uma melhora na germinação foi observada na maioria das espécies de *Vriesea*, com exceção de *V. hieroglyphica*, para a qual o GA₃ parece ter efeito inibitório na germinação.

Com o objetivo de realizar a conservação *in vitro* de *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith, uma bromélia ameaçada de extinção, Bencke e Droste (2008) obtiveram 100% de germinação das sementes utilizando meio MS com 20 g L⁻¹ de sacarose e 4 g L⁻¹ de phytigel.

Em estudos com *Vriesea gigantea* e *V. philippocoburgii*, Droste et al. (2005) obtiveram diferentes taxas de germinação entre as espécies, sendo que a taxa de *V. gigantea* foi superior à de *V. philippocoburgii*. Os autores afirmam que esse desempenho diferencial das espécies enfatiza a importância de pesquisas contínuas para que sejam estabelecidas as condições *in vitro* ideais para as culturas específicas.

A viabilidade de sementes e as taxas de germinação e mortalidade estão entre os aspectos pouco estudados da reprodução e fertilidade das bromélias (BENZING, 2000; MARTINELLI, 1997). Há variação destes aspectos dentro da família Bromeliaceae uma vez que as espécies respondem de maneira diferente a estímulos de luz e temperatura (DOWNS, 1963; BENZING, 2000). Assim, estudos sobre a germinação de sementes são importantes para fornecer informações úteis à tecnologia de sementes, para a compreensão da ecofisiologia das espécies vegetais (BORGHETTI; FERREIRA, 2004), do ciclo biológico e dos processos de estabelecimento da vegetação nativa, assim como para a produção de mudas em viveiros (ÉDER-SILVA et al., 2008).

2.4.2. Propagação vegetativa (assexual)

A propagação vegetativa em bromélias ocorre por separação de brotos laterais, os quais são formados a partir de gemas axilares (BARACHO, 1997). Estes podem se desenvolver a partir de tecidos meristemáticos presentes nas axilas foliares, rizomas ou estolões, com estrutura e potencial de desenvolvimento similares ao meristema apical (TAIZ; ZEIGER, 1991). Em Bromeliaceae, o propágulo vegetativo mais comum é o rizoma caracterizado como caule subterrâneo, que cresce abaixo da superfície do solo e tem como função proteger a planta de ambientes severos por armazenar nutrientes de reserva. O rizoma ocorre em espécies como *Aechmea aquilega*, *A. blanchetiana*,

Hohenbergia catinae e *Portea leptantha*. Estolões são caules que podem se formar acima ou abaixo do nível do solo e são comuns em *Cryptanthus burle-marxii* (BARACHO, 1997).

Durante ou depois do florescimento as bromélias produzem um ou mais brotos laterais, os quais se removidos da planta-mãe, podem ser utilizados como mudas (BARACHO, 1997; DE PAULA, 2000). Variações em relação ao tamanho e tipo de propágulo são comuns entre as espécies de bromélias (SMITH; DOWNS, 1979; BARACHO, 1997).

Como todo método de propagação, a propagação vegetativa possui certas vantagens, como a obtenção rápida de plantas adultas, propagação de híbridos que dificilmente produzem sementes e, certamente, a obtenção de plantas iguais à planta mãe. Entretanto não permite a obtenção de grandes quantidades de mudas e não é possível obter variabilidade genética a partir de uma única planta (DE PAULA, 2000).

2.4.2.1. Micropropagação: escolha de explantes e dificuldades encontradas

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos, e aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os primeiros estudos *in vitro* com bromélias datam do início dos anos 70 quando Jones; Murashige (1974) fizeram culturas de pontas de raízes de *Aechmea fasciata* em meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementados com ANA e AIB (ácido indol 3-butírico) e lograram a regeneração de plantas. Reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura para obtenção de certa resposta morfogênica podem variar de acordo com a espécie, tipo de explante, período de crescimento, entre outras características (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Muitas espécies de bromélias apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro* devido à forte dominância apical (CLINE, 1994), característica desta família. Assim, a escolha do explante é muito importante para o sucesso da introdução *in vitro* (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Explantes obtidos de culturas já estabelecidas *in vitro*, como explantes de folhas, têm sido utilizados por muitos pesquisadores (HOSOKI; ASAHIRA, 1980; CARNEIRO et al., 1999). Estudos revelaram (MERCIER; KERBAUY, 1991; 1993) que o uso de

folhas jovens como explantes produziram taxas de proliferação muito mais altas do que as obtidas a partir de explantes de plantas já maduras. Devido à presença de meristemas intercalares na base de folhas de monocotiledôneas que podem conter células competentes para a re-diferenciação quando ativadas por sinais regulatórios, como fatores de regulação de crescimento (ALVES; DAL VESCO; GUERRA, 2006), este tipo de explante é uma boa escolha para indução de brotos e posterior multiplicação (HOSOKI; ASAHIRA, 1980).

Alves et al. (2006), ao utilizarem folhas jovens de *Vriesea reitzii* como explantes iniciais em meio MS com 20 mM de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 1mM de Kin (cinetina), obtiveram taxas de indução de calos de 90,6 %. A subcultura desses calos em meio MS com BAP, Kin e 2-iP (2-isopenteniladenina) proporcionou a regeneração de 60 brotos por grama de calo. O desenvolvimento completo de plantas foi obtido a partir da transferência desses brotos primeiramente para meio MS suplementado com 2,5 mM de 2-iP e 0,5 mM de ANA e, posteriormente, para meio MS sem reguladores de crescimento vegetal. A taxa de sobrevivência das plantas após a aclimatização foi de 90%.

Esse tipo de explante também foi utilizado com sucesso nos estudos de Vinterhalter e Vinterhalter (1994) que obtiveram brotos adventícios a partir de calos induzidos de explantes de folha de *Aechmea fasciata*.

Protuberâncias com alto potencial regenerativo e similares ao descrito por Alves, Dal Vesco e Guerra (2006) foram observadas na cultura de tecidos de *V. reitzii* (RECH FILHO et al., 2005). É possível que este padrão morfogenético seja característico do gênero *Vriesea* podendo ser observado também em outros gêneros da família Bromeliaceae.

Arrabal et al. (2002) utilizaram ápices caulinares de *Cryptanthus sinuosus* (Bromeliaceae) de plantas com 4 a 6 meses de idade, sendo que os melhores resultados de regeneração foram obtidos a partir de explantes introduzidos em meio MS líquido sem hormônio ou em meio suplementado com 2,2 mM de BAP e 0,05 mM de ANA, o que é considerado viável para manter a estabilidade genética (PENNY, 1999).

Para *Dyckia distachia*, uma bromélia ameaçada de extinção, culturas de brotos foram induzidas a partir de explantes de talos de flores (DAQUINTA; ALMEIDA; GUERRA, 1998). No Brasil, a utilização dessas técnicas para bromélias têm permitido a micropropagação massal de *Vriesea*, *Tillandsia*, *Neoregelia* e *Guzmania*, além de outras espécies, para o abastecimento do mercado da floricultura, prevenindo assim, o

extrativismo (MERCIER; KERBAUY, 1995). Também foi obtida com sucesso a propagação de *Cryptanthus sinuosos* (CARNEIRO et al., 1998), *Ananas comosus* (GUERRA et al., 1999; DAL VESCO et al., 2001) e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (ALVES; GUERRA, 2001).

Santos (2009) verificou que a propagação em massa de *Acanthostachys strobilacea* (Bromeliaceae) por segmentos nodais estiolados em meio MS diluído cinco vezes, possibilita a otimização da produção, já que estes explantes possuem taxa de regeneração de 100 % na ausência de reguladores de crescimento. Portanto as plantas cultivadas em MS/5 (meio com diluição de um quinto dos macronutrientes do meio MS), que promove o crescimento da parte aérea, podem ser uma opção para propagação clonal já que o isolamento dos segmentos nodais é facilitado quando se utilizam caules alongados como fonte de explante.

Uma ótima alternativa para micropropagação de bromélias, é a utilização de ápices caulinares de brotos laterais de rápido crescimento geralmente produzidos durante ou após o florescimento. A oxidação e contaminação são freqüentemente reduzidas e a dominância apical é evitada. Depois da retirada do broto lateral da planta doadora, as folhas são removidas e o explante consiste de segmento do ápice do caule, composto pelo meristema apical vegetativo (0,05 a 1,0 mm), juntamente com os primórdios foliares e folhas em desenvolvimento (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006; GUERRA; NODARI, 2006). O explante é introduzido *in vitro* e geralmente cultivado sob condições de luz e em meio contendo citocininas, devendo as condições de cultivo ser definidas conforme a espécie (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Carneiro et al. (1999) mencionaram alta mortalidade de explantes e oxidação quando brotos axilares de *Neoregelia cruenta* foram utilizados em diferentes combinações de reguladores de crescimento. A utilização de meio líquido mostrou certa eficiência na prevenção da oxidação e na micropropagação de *Quesnellia quesneliana*, *Vriesea poelmannii*, *Aechmea fasciata* e *Guzmania* spp. (HOSOKI; ASAHIRA, 1980).

Apesar das vantagens que a técnica de micropropagação oferece, existem alguns fatores que limitam a micropropagação de espécies vegetais. Dentre estes estão as altas taxas de oxidação (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006), a qual é resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina pelo tecido danificado (VAN WINKLE; JOHNSON; PULLMAN, 2003), o que compromete a absorção de metabólicos pelo explante. Outro fator limitante é a grande incidência de

contaminação fúngica e/ou bacteriana, proveniente do explante (contaminação endofítica), ou do meio ambiente (LACERDA; LEMOS, 2008).

Comumente utilizam-se substâncias antioxidantes em meios de cultura para reduzir as taxas de oxidação, como ácido ascórbico e carvão ativado. Ebert, Taylor e Blake (1993) e Pan e Van Standen (1998) observaram que além de metabólitos tóxicos, como os fenólicos, o carvão ativado pode também absorver hormônios (auxinas e citocininas) e produtos do metabolismo da planta (exudados). Alguns autores (MARKS; SIMPSON, 1990) relataram aumento do número de explantes viáveis com a diminuição da intensidade luminosa fornecida à planta doadora dos explantes. A ausência de luz, ou a baixa intensidade luminosa, limita a ativação de enzimas envolvidas na oxidação dos compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Segundo Azofeifa (2009), existem outras alternativas para diminuir a oxidação, como a redução da temperatura da sala de cultivo, menor concentração de sais no meio de cultura utilizado, uso de meio líquido e trocas freqüentes de meio de cultura.

Um dos princípios básicos para o sucesso da cultura de tecidos depende, em parte, de medidas de controle e prevenção da contaminação microbiana (SILVA et al., 2003). A assepsia do material vegetal é de fundamental importância na micropropagação e, sendo efetuada com sucesso, evitará contaminação no meio de cultura por fungos e bactérias, que ocasionam perdas do material vegetativo e do meio de cultura (RODRIGUES et al., 2003).

Os microrganismos que têm sido isolados com maior freqüência são os fungos, as leveduras e as bactérias (LEGGATT et al., 1988). Geralmente, fungos e leveduras crescem bem nos meios de cultura utilizados para as plantas, podendo ter sua presença identificada logo no início do cultivo. Entretanto, os maiores problemas normalmente estão relacionados com as contaminações bacterianas, especialmente aquelas que permanecem latentes *in vitro* (contaminação endofítica), ou seja, não apresentam crescimento visível no meio nem sintomas nos tecidos. Freqüentemente não se evidencia de imediato a presença de bactérias nas plantas, sendo detectada somente após algum tempo de cultivo, geralmente quando um grande número de plantas já está propagado. Além disso, por serem de difícil visualização, são facilmente transmitidas de um material para outro durante a manipulação dos explantes Pereira, Mattos e Fortes (2003).

Quando as condições do meio de cultura (nutrição, pH – potencial hidrogeniônico) tornam-se favoráveis ao seu desenvolvimento, as bactérias passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura (PEREIRA; MATTOS; FORTES,

2003) comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento da cultura, podendo levá-la rapidamente à morte. Esta deterioração dos explantes está relacionada com a produção de metabólitos fitotóxicos pelas bactérias, tais como os ácidos láctico e acético, cianeto, além de certos reguladores de crescimento e antibióticos (LEIFERT et al., 1991). Portanto, é essencial o desenvolvimento de protocolos eficazes de assepsia dos explantes a serem utilizados na micropropagação para obtenção de sucesso no processo como um todo (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003), considerando que a maior incidência de contaminações ocorre na fase de estabelecimento do explante (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003). Braga, Sá e Mustafá (2001), por exemplo, observaram em experimentos com bananeiras, que as perdas de explantes por contaminações na fase de estabelecimento da cultura podem chegar a 75 %, o que pode comprometer a multiplicação em nível comercial por dificultar o término do processo de obtenção da muda.

Em laboratórios comerciais de micropropagação de plantas, Leifert et al. (1991) identificaram 293 espécies de bactérias, das quais 13 % pertenciam ao gênero *Bacillus*. As espécies deste gênero formam endósporos resistentes ao etanol e ao calor, podendo, inclusive, ser disseminadas pelo etanol utilizado na esterilização dos instrumentos e resistir à flambagem e à autoclavagem do meio de cultura, que é feita por 20 minutos a 110 °C (NANNETTI, 1994).

Do ponto de vista prático, as culturas contaminadas devem ser autoclavadas e descartadas. É necessário, no entanto, a busca por medidas de prevenção do surgimento da contaminação, que podem ser obtidas através de tratamentos com o uso de antibióticos e fungicidas no meio de cultura (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003). Grattapaglia; Machado (1998) citam que o antibiótico deve ser esterilizado a frio e adicionado ao meio antes da sua solidificação, e também apresentar um amplo espectro de ação. Os antibióticos mais usados em cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não bactericida (CARNEIRO et al., 2000).

Usualmente, essas substâncias são incorporadas ao meio de cultura por períodos que variam de dias a meses. Ressalta-se, entretanto, que o sucesso do trabalho com antibióticos somente pode ser obtido após o isolamento, identificação e realização de testes de sensibilidade das bactérias. Por causa da fitotoxicidade e alto custo do tratamento, os antibióticos devem ser utilizados apenas para contaminantes específicos das culturas, pois somente as bactérias que estiverem dentro do espectro de ação de cada antibiótico serão controladas (LEIFERT et al., 1991; TENG; NICHOLSON, 1997).

Para contaminação fúngica recomenda-se o uso de benomyl (HALDEMAN; THOMAS; MCKAMY, 1987) e o controle de bactérias endógenas pode ser efetivado através da ampicilina, carbecilina, rifampicina, trimetropina, polimixina e da cefotaxima, em diferentes concentrações (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). Além disso, os pré-tratamentos aplicados, a forma de manejo e a origem das plantas matrizes são determinantes para o controle da contaminação por microrganismos, principalmente quando relacionada aos microrganismos endofíticos (NAKANO, 2008).

Existem na literatura vários estudos e experimentos envolvendo o processo de assepsia realizada anteriormente à introdução do explante *in vitro*.

Pereira et al. (2009), trabalhando com ápices caulinares, gemas e segmentos foliares de plantas mantidas em casa de vegetação (*Canistropsis billbergioides* e *Pitcairnia flammea*) e após o processo de assepsia tradicional, obtiveram 100 % de contaminação para todos os tipos de explantes quando estes foram mantidos sob luz e 50 % de contaminação dos explantes foliares quando foram cultivados no escuro. Gemas e meristemas não apresentaram sinais de contaminação, entretanto pôde-se notar sinais de necrose tecidual.

Rodrigues (2005), trabalhando com ápices caulinares de *Heliconia rauliniana*, obteve 66 % de explantes inoculados sem contaminação com o uso de 500 mg .L⁻¹ de cefotaxima.

Por outro lado, existem as bactérias promotoras de crescimento, conhecidas na literatura como “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR), ou “rhizobacteria promotora de crescimento de plantas” (RPCP), que colonizam diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, podendo promover aumentos na taxa de germinação de sementes, no desenvolvimento de órgãos, na produção de flores e no rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (AMORIM; MELO, 2002; DEY et al., 2004). Durante a micropropagação, a bacterização de plantas com RPCP tem sido recomendada para aumentar a tolerância a estresses bióticos e abióticos, induzindo alterações no metabolismo e no desenvolvimento vegetal. Essas alterações podem se traduzir em promoção de crescimento e aumento da resistência a patógenos no transplante (NOVAK, 1998, SRINATH; BAGYARAJ; SATYANARAYANA, 2003).

2.4.2.1.1. Meios de cultura e nutrição mineral *in vitro*

O meio de cultura mais comumente utilizado, em 50 a 75 % dos casos, para micropropagação de plantas é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), formulado inicialmente para cultura de calos de tabaco. Mas, de acordo com Gerald (1995), não existe uma única fórmula capaz de promover e/ou manter o crescimento ótimo de diferentes tecidos.

Apesar do meio MS não ser ótimo para muitos tecidos, ele permite o crescimento podendo assim servir como ponto de partida para o aprimoramento e adaptação de meios para determinadas espécies e objetivos do cultivo *in vitro* (NIEDZ; EVENS, 2007), uma vez que a composição mineral ideal nos meios de cultura varia em função da espécie (WILLIAMS, 1991; GONÇALVES et al., 2005), da origem do explante (TOMBOLATO, 1998) e entre os diferentes estágios de formação de órgãos e tecidos meristemáticos e crescimento das plantas (DINIZ et al., 1999; RAMAGE; WILLIAMS, 2002; KANASHIRO et al., 2009).

Assim, é importante a escolha do meio de cultura mais adequado para a espécie a ser micropropagada (NIEDZ; EVENS, 2007), uma vez que entre os fatores que influenciam no crescimento *in vitro* da planta, os nutrientes desempenham importante papel, pois são essenciais ao desenvolvimento da planta por serem componentes estruturais dos ácidos nucléicos, aminoácidos, pigmentos, parede celular além de regular reações enzimáticas, atuar na regulação osmótica, entre outros (MONTEIRO et al., 2000; NIEDZ; EVENS, 2007). Uma vez que o crescimento do tecido, a extensão e qualidade das respostas morfogenéticas são fortemente influenciadas pelo tipo e concentração dos nutrientes fornecidos (NIEDZ; EVENS, 2007), a deficiência de algum nutriente (macro ou micronutriente) nas plantas pode causar desordem no metabolismo (MONTEIRO et al., 2000; NAS; READ, 2004). Sendo assim, o suprimento de macro e micronutrientes para meio de cultura é uma parte essencial dos sistemas de cultivo *in vitro* (KANASHIRO et al., 2009).

Além disso, plantas crescidas *in vitro* diferem, com relação a nutrição, notadamente daquelas crescidas *in vivo* (GRIBBLE et al., 2002; KANASHIRO et al., 2009). A maior diferença está relacionada com a interface planta/nutriente. O sistema radicular de plantas crescidas *in vivo* provém uma grande área superficial e permite uma absorção mais efetiva dos minerais. Plantas provenientes do ambiente *in vitro* geralmente possuem sistema radicular pouco desenvolvido e dependem de células não especializadas para absorção dos nutrientes (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995). Ademais, o ambiente é fornecedor de nutrientes através da mineralização da matéria orgânica e trocas iônicas

na solução do solo. Assim, plantas crescidas *in vivo* têm um suprimento relativamente contínuo de nutrientes enquanto que *in vitro*, o meio de cultura contém uma concentração definida destes e que somente são repostos quando as culturas são subcultivadas para meio novo. Enquanto existem diferenças fundamentais entre plantas provenientes de condições *in vitro* ou *in vivo*, os princípios básicos de absorção e transporte dos minerais são os mesmos (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995; WILLIAMS, 1995).

Um ponto importante levantado por Williams (1995) é que deve ser feita uma distinção entre o esgotamento dos nutrientes no meio de cultura e a deficiência para a cultura. A taxa de absorção de um determinado íon pode ser maior do que sua exigência nutricional. Como resultado, determinados íons podem se acumular na cultura, permitindo crescimento contínuo e possivelmente afetando o desenvolvimento (WILLIAMS, 1995). Poucos estudos envolvendo absorção dos nutrientes, seu transporte e metabolismo *in vitro* têm sido desenvolvidos (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Em cultura de tecidos, a principal fonte de todos os nutrientes do meio de cultura é uma mistura de sais minerais, que inclui os macro e micro nutrientes fornecidos juntamente com uma fonte de carbono, geralmente a sacarose, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento vegetal (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Monteiro et al. (2000) basearam-se nas proporções dos elementos encontradas em plantas saudáveis crescidas *in vitro* para determinar uma composição adequada no meio de cultura para maracujazeiro. Esta metodologia também foi avaliada por Higashi (1996) para eucalipto e por Diniz (1996) para bananeira, com sucesso. Para a utilização desses métodos, entretanto, é preciso levar em conta que o conteúdo mineral de uma planta é influenciado por sua idade (MARSCHNER, 1995).

A composição de um meio de cultura deve levar em conta os seguintes itens: a) a formulação deve refletir o conteúdo elementar dos organismos; b) os elementos devem estar presentes em uma forma molecular ou iônica que pode ser absorvida e metabolizada pelos organismos; c) para preparação laboratorial é conveniente que o número de reagentes químicos a ser utilizado para compor a mistura seja o menor possível; e d) para produções em grande escala e aplicações comerciais é preferível que o custo dos vários constituintes do meio de cultura seja o menor possível (SPAARGAREN, 1996). O meio líquido é algumas vezes utilizado como forma de reduzir esses custos e o período de tempo nas culturas, além da maior facilidade na troca do meio (ALVARD et al., 1993). Alguns autores defendem que o agente solidificante ágar, quando presente no meio de

cultura, altera a disponibilidade de água e nutrientes e muda a composição química do meio, conforme o teor de impurezas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Apesar da importância da nutrição mineral no crescimento *in vitro* de mudas, ainda são necessários estudos relacionados à aquisição ou uso eficiente destes nutrientes, ou do efeito dos nutrientes na morfogênese (RAMAGE; WILLIAMS, 2002; KANASHIRO et al., 2009). Presume-se que os componentes minerais do meio de cultura desenvolvem um papel essencial no processo de regeneração. Entretanto, estudos recentes sugerem uma complexa rede de interações entre o explante e o meio de cultura (WILLIAMS, 1993; 1995). Além disso, Preece (1995) afirmou que com a composição ajustada dos componentes minerais no meio de cultura, pode ser possível reduzir as concentrações dos reguladores de crescimento vegetais.

Neste contexto, são necessárias pesquisas no sentido de analisar a utilização dos nutrientes durante o crescimento e multiplicação das plantas *in vitro*, de forma que a quantidade fornecida no meio não seja um fator limitante ao desenvolvimento do vegetal e que também não seja excedente. No cultivo *in vitro*, as quantidades de nutrientes fornecidas e o balanço dos mesmos, são fatores determinantes na sua utilização pelas plantas (DINIZ et al., 1999).

Embora existam muitos relatos sobre adequação de meios de cultura, os objetos de estudo mais freqüentes envolvem o tipo de regulador de crescimento e concentração do mesmo, enquanto pouco tem sido feito com relação à nutrição mineral *in vitro*, como ocorre com as bromélias (ENDRES; MERCIER, 2001; NIEVOLA; MERCIER; MAJEROWICZ, 2001).

Apesar de já terem sido definidos meios específicos para algumas espécies, como para oliveira (COZZA et al., 1997), eucalipto (GRIBBLE et al., 2002) e macieira (SOTIROPOULOS, 2007), a existência de 14 elementos minerais essenciais e que interagem entre si, dificulta a formulação de novos meios ideais para cada espécie (NAS; READ, 2004; NIEDZ; EVENS, 2007).

Para bromeliáceas em geral, o meio MS com metade da concentração de macronutrientes apresenta bons resultados (GROSSI, 2000), embora alguns autores recomendem a utilização do meio Knudson (KNUDSON, 1946) pela maior concentração de fósforo (MERCIER; KERBAUY, 1991; 1993).

A nutrição mineral dos membros epífitas da família Bromeliaceae está entre os aspectos menos conhecidos, porém mais importantes para a adaptação a ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes. A existência de representantes no dossel seco e pouco

fértil indica que, além de outras capacidades, as bromélias e outras plantas de habitat similar possuem mecanismos incomuns de absorção de nutrientes obtidos de fontes pouco nutritivas de modo que possam utilizar o substrato limitado com elevada eficiência (BENZING; RENFROW, 1980).

Para todas as epífitas, a literatura indica que a água da chuva é uma fonte significativa de vários nutrientes (TUKEY, 1970), pois atua como um veículo de sais inorgânicos e moléculas orgânicas, incluindo compostos nitrogenados lixiviados da planta hospedeira. Além disso, Benzing (1976) mostrou que pequenas moléculas orgânicas contendo nitrogênio podem ser absorvidas pelos tricomas de Bromeliaceae.

Sabe-se que nas plantas epífitas as raízes servem, principalmente, para fixação da planta ao hospedeiro, ficando a cargo das folhas a nutrição da planta (REITZ, 1983). Porém, em algumas pesquisas, avaliando-se os efeitos da absorção de nutrientes pelas raízes e folhas, observou-se que, em algumas espécies, mesmo sendo epífitas como *Aechmea fasciata* (KÄMPF, 1994) e *Vriesea fosteriana* (NIEVOLA; MERCIER, 1996), as raízes contribuem significativamente para a nutrição da planta, atuando na absorção de nutrientes (AMARAL et al., 2009).

Poucos estudos envolvem a nutrição mineral de bromélias epífitas *in vitro*. Aranda-Peres et al. (2009) estudaram o crescimento de plantas de três espécies de *Vriesea* (*V. hieroglyphica*, *V. unilateralis*, e *V. friburguensis*) em três meios de cultura MS modificados (M2, M3 e M4) com diferentes composições minerais, sendo que a principal diferença entre eles foi a concentração de cálcio (3,0, 6,0 e 12,0 mM, respectivamente). As plantas cultivadas no meio M4 apresentaram acúmulo significativamente maior de massa fresca e seca, indicando um maior crescimento das mesmas. Como espécies do gênero *Vriesea* apresentam um crescimento muito lento e algumas estão ameaçadas de extinção, esse já é considerado um grande avanço na propagação das mesmas. Entretanto, resultados obtidos pelos mesmos autores para os demais nutrientes e comparando-os aos níveis de nutrientes recomendados pela literatura (MILLS; JONES, 1996), observou-se em plântulas cultivadas neste meio que os níveis de Mg (magnésio) e Cu (cobre) ainda apresentam-se em baixa concentração, enquanto que Fe (ferro) e N (nitrogênio) nas folhas das espécies de *Vriesea* estudadas no referido trabalho apresentam-se em excesso.

A maioria dos estudos encontrados na literatura aborda a importância do nitrogênio. O nitrogênio é constituinte de muitos componentes da célula vegetal, como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (TAIZ; ZEIGER, 1991). O crescimento das plantas é fortemente influenciado pela concentração e formas de nitrogênio presente no ambiente,

sendo que NH_4^+ e NO_3^{-2} são as principais formas absorvidas pelas plantas. Assim, a maioria dos estudos existentes nesse contexto envolve a absorção e assimilação destes dois íons (ENDRES; MERCIER, 2003), embora as plantas absorvam também nitrogênio orgânico - uréia e aminoácidos (ENDRES; MERCIER, 2001). A deficiência em nitrogênio exerce importante efeito sobre o aparato fotossintético, limitando a biossíntese e quantidade de clorofila e da RUBISCO, e, conseqüentemente, diminuindo a fotossíntese das folhas (ENDRES; MERCIER, 2001).

Há evidências de que o nitrogênio também pode afetar os níveis de hormônios. A proporção de NO_3^- : NH_4^+ não promoveu efeito significativo nos níveis de citocinina em exudatos do xilema de plantas de gergelim (*Sesamun indium* L.) (ALI et al., 2000); enquanto que os níveis de citocininas no xilema de porta-enxertos de macieira se tornaram maiores com fornecimento apenas de NH_4^+ e não de NO_3^- (BUBA'N et al., 1978; MERCIER et al., 1997; ENDRES; SOUZA; MERCIER, 2002).

Em um meio de regeneração típico, o nitrogênio é geralmente fornecido como nitrato e amônia (RAMAGE; WILLIAMS, 2002). Nitrato tem sido considerado a principal forma de nitrogênio na cultura de tecidos vegetais (SATHYANARAYANA; BLAKE, 1994) e em vários estudos poderia servir como única fonte de nitrogênio para morfogênese (COUSSON; VAN THANH TRAN, 1993; RAMAGE, 1999). Scheible et al. (1997a; 1997b) apresentaram evidências convincentes do papel do nitrato na regulação do desenvolvimento da planta.

Certas bromélias, como *Pitcairnia flammea*, não sobrevivem na presença de concentrações de nitrato maiores que 4,0 mM (NIEVOLA, 1997). Da mesma forma, a espécie *Aechmea nudicaulis* apresentou, em estudo realizado por Grossi (2000), maior crescimento na concentração de 7,5 mM (105 mg L^{-1}) de nitrogênio, ou seja, quantidades bem inferiores àquelas presentes na formulação do MS original. A utilização de diluições dos macronutrientes do meio MS tem propiciado o desenvolvimento satisfatório de várias espécies vegetais, dentre elas, de algumas bromélias (MERCIER; KERBAUY, 1992; MERCIER; KERBAUY, 1994; VINTERHALTER; VINTERHALTER, 1994; PICKENS et al., 2003).

Em estudo desenvolvido por Endres e Mercier (2001) com abacaxizeiro (*Ananas comosus*), o crescimento das plantas respondeu linearmente ao aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultura (0, 1, 5, 10, 20 e 50 mM) não havendo diferença entre uréia ou nitrato. Algumas plantas, entretanto, apresentaram necrose com concentrações de 50 mM de NH_4^+ no meio, enquanto que o mesmo não ocorreu quando a fonte de

nitrogênio empregada era uréia. O fato de o crescimento desta bromélia ter sido estimulado em concentrações altas deste nutriente pode refletir uma adaptação desta Bromeliaceae ao ambiente terrestre no qual o nitrogênio é relativamente mais abundante quando comparado ao epífita. Por outro lado, plantas de *V. gigantea*, uma espécie epífita de crescimento lento e exposta a uma constante deficiência nutricional em seu habitat natural mostraram-se mais eficientes em absorver o nitrogênio e atingiram seu potencial máximo sob menores concentrações deste elemento (ENDRES; MERCIER, 2001).

Nievola, Mercier e Majerowicz (2001) afirmam que o crescimento de bromélias não foi favorecido quando NO_3^- foi fornecido como única fonte de nitrogênio em culturas assépticas quando em comparação com seu fornecimento juntamente com NH_4^+ , quando houve incremento significativo no acúmulo de matéria fresca e seca.

Os outros macronutrientes apresentam funções bioquímicas diversas. O potássio desempenha importante papel na regulação osmótica das células e é necessário para a ativação de enzimas envolvidas na respiração e na fotossíntese. O cálcio é constituinte das paredes celulares, é utilizado durante a divisão celular e exerce o papel de mensageiro secundário em várias respostas da planta. O fósforo é componente das membranas celulares, de nucleotídeos do ATP (adenosina trifosfato) e dos ácidos nucléicos. O enxofre é constituinte de várias coenzimas e vitaminas essenciais no metabolismo e é encontrado em dois aminoácidos (cisteína e metionina) (TAIZ; ZEIGER, 1991). Um desequilíbrio nutricional pode ter um efeito negativo na morfogênese (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

O Mg^{2+} é o cátion bivalente mais abundante no citossol das células vegetais e é exigido para o funcionamento de várias enzimas, incluindo a RNA (ácido ribonucléico) polimerase, proteínas quinases, fosfatases, glutatona sintetase e carboxilases. Sua função em plantas, bem como em animais, está relacionada com sua capacidade de interagir com ligantes nucleofílicos. É o átomo central da molécula de clorofila (DINIZ et al., 1999) Enzimas chave dos cloroplastos são fortemente afetadas por variações mínimas nos níveis de Mg^{2+} , evidenciando sua importância na manutenção da homeostase celular nas plantas (SHAUL, 2002). Este elemento também facilita a absorção radicular de outros elementos, principalmente do potássio (MALAVOLTA, 1980).

Veliky et al. (1976), utilizando cultura de suspensões celulares de *Ipomoea* sp., demonstraram que a absorção do magnésio aumentou quando uma maior quantidade deste se encontrava no meio e quando o pH era mais alto. A absorção de magnésio pelas

plantas em condições de campo também é influenciada pelo pH e pela quantidade de cálcio no solo (MARSCHNER, 1995).

Com relação aos micronutrientes, existem poucos estudos sobre o papel destes embora alguns micronutrientes sejam responsáveis por aumentar significativamente a regeneração *in vitro* (RAMAGE; WILLIAMS, 2002). A planta deve então equilibrar a absorção, utilização e acúmulo destes metais a fim de manter a homeostase (GROTZ; GUERINOT, 2006). Por exemplo, um nível elevado de Cu_2SO_4 no meio de cultura otimizou a regeneração de brotos a partir de calos de trigo e em discos de folha de tabaco (PURNHAUSER; GYULIA, 1993), sendo que o cobre está associado a enzimas envolvidas em reações redox. O boro tem funções relacionadas ao alongamento celular, síntese dos ácidos nucléicos e respostas hormonais. Os íons de manganês são responsáveis pela ativação de enzimas do ciclo de Krebs. O zinco também está envolvido com a ativação de enzimas e está envolvido com a biossíntese de clorofila em algumas plantas. (TAIZ; ZEIGER, 1991).

O ferro tem importante papel como componente de enzimas que participam das reações redox, como os citocromos (TAIZ; ZEIGER, 1991). A definição precisa do papel do ferro é complicada devido à interação entre o ferro e outros micronutrientes. Por exemplo, o excesso de manganês pode causar uma deficiência induzida de ferro enquanto que o excesso de ferro pode reduzir a absorção de manganês e zinco (WILLIAMS, 1995).

2.4.2.1.2. Aclimatização e cultivo em casa de vegetação

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o sistema de micropropagação é composto de três estágios, como já foi mencionado, sendo que o estágio III envolve a transferência de plantas micropropagadas *in vitro* para meio de enraizamento e subsequente transplante das mesmas para substrato ou solo. Este processo é chamado de aclimatização e se constitui em uma fase crítica e, muitas vezes, em um fator limitante do processo de micropropagação, sendo uma importante etapa na formação de mudas de qualidade (BANDEIRA et al., 2007). Isso ocorre, pois as mudas propagadas por técnicas de micropropagação geralmente apresentam alterações significativas causadas pelas condições *in vitro*, as quais diminuem a capacidade de sobrevivência após a transferência para condições ambientais *ex vitro* (DOUSSEAU et al., 2008). A presença de estômatos não funcionais e de parênquima paliçádico pouco desenvolvido é citada como a principal

causa da mortalidade de plantas transferidas do ambiente *in vitro* para *ex vitro* (HAZARIKA, 2006).

Segundo Hazarika (2006), o ambiente *in vitro* se caracteriza como um ambiente estável, saturado em umidade, protegido, estéril, de baixa irradiância (12 a 70 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura relativamente alta e constante (20 a 28 °C), reduzidas trocas gasosas entre os recipientes e a atmosfera externa (CALVETE et al., 2002), além das elevadas concentrações de carboidratos e reguladores de crescimento no meio de cultura (POSPÍSILOVÁ et al., 1999). A transferência das plantas para um ambiente instável, não estéril e com umidade reduzida, pode resultar na morte das plantas, baixas taxas de crescimento e longos períodos para obtenção de plantas completamente aclimatadas (BANDEIRA et al., 2007). Além disso, a planta passa de uma condição heterótrofa para autótrofa, podendo sofrer estresse fisiológico (BANDEIRA et al., 2007). A existência de poucos estudos neste assunto agrava esse quadro (SOUZA JUNIOR et al., 2001).

Devido à plasticidade fenotípica das plantas (BARBOZA et al., 2006) durante o processo de aclimatização, as plantas apresentam alterações graduais na morfologia externa e interna dos sistemas radicular e aéreo, de modo a se adaptarem ao ambiente externo (SUTTER; SCHAKEL 1992). Essas adaptações são mais expressivas no sistema aéreo, principalmente nas folhas (EHRENDORF, 1973; SUTTER; HUTZELL, 1984).

Por esta razão, uma alternativa para aprimorar a eficiência da aclimatização é a exposição gradual das plantas a maiores temperaturas e irradiância e menor umidade relativa, características do ambiente *ex vitro*, a fim de que estas alterações se concretizem, aumentando assim as chances de sobrevivência das plantas (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996; GRATAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Com relação às bromélias, as plantas derivadas de cultivo *in vitro*, geralmente são aclimatizadas em bandejas de plástico em câmara de nebulização, na qual a umidade vai sendo diminuída gradualmente. Depois, são transferidas para uma estufa e quando bem desenvolvidas são plantadas em vasos, observando-se alta taxa de sobrevivência durante a aclimatização (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

As bromélias são sensíveis a quantidades de água excessivas em seu sistema radicular. Deste modo o regime de irrigação e de substratos em vaso é de extrema importância. Sob altas temperaturas, a nebulização de água sobre a superfície das folhas é o melhor método para a irrigação, principalmente para espécies de *Tillandsia* adaptadas a ambientes com baixa umidade (DE PAULA, 2000).

Na produção comercial de bromélias utiliza-se preferencialmente a irrigação por nebulização ou por sistemas mistos. A irrigação por gotejamento dificulta uma distribuição uniforme de água e é recomendada apenas para menores produções. A circulação de ar na estufa é também um fator importante (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Os substratos são geralmente compostos de materiais sólidos, distintos do solo, constituídos de substâncias naturais, residuais, minerais ou orgânicas, os quais misturados, ou puros, são utilizados para fixação do sistema radicular nas bandejas, vasos ou terraços, dando suporte às plantas (CADAHIA, 1998). Agem diretamente em termos da arquitetura do sistema radicular, do estado nutricional, ou do movimento de água. Variações na composição do substrato para dadas espécies devem ser feitas com cuidado a fim de evitar perdas significativas na produção comercial de plantas (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). A procura por novos substratos, de baixo custo, alta disponibilidade e adequados para cada cultivo tem sido tema de vários estudos (FONTES et al., 2004). O substrato é geralmente definido de acordo com as propriedades físicas das misturas e disponibilidade do material (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006) e, segundo Minami (1995) deve ser estéril, com alta capacidade de retenção de água e sem impurezas químicas. O substrato representa apenas 3% do custo total da produção de plantas ornamentais, entretanto a utilização do substrato adequado pode aumentar o valor comercial da planta em 10 a 30%. Entre os materiais mais utilizados estão a turfa, compostos orgânicos e resíduos de agroindústria como: cascas de amendoim, de árvores, bagaço de cana, fibra de côco, entre outros (KAMPF, 1993).

Estudos feitos por Aranda-Peres (2005) indicaram que as espécies *Aechmea nudicaulis* e *A. distichantha* apresentam diferentes necessidades em relação aos substratos para cada fase de crescimento. De maneira geral, os substratos que se mostraram mais adequados para estas espécies foram: casca de pinus + argila expandida + turfa (3:2:1), fibra de côco + casca de arroz carbonizada + turfa (3:2:1) e o substrato comercial Plantmax® HT, possivelmente devido à pequena retenção de água nos vasos.

Em estudo realizado com aclimatização de plântulas de abacaxizeiro, por Souza Junior et al. (2001), a maior taxa de sobrevivência se deu quando as plântulas foram transplantadas em Plantmax® ou em mistura areia/xaxim/húmus promovendo também melhores taxas de crescimento e desenvolvimento das plântulas, sendo que a utilização de areia como substrato comprometeu totalmente a sobrevivência das plantas. Estes resultados são similares aos apresentados por Fauth et al. (2004), em que substratos

compostos por solo + areia + xaxim + turfa e solo + areia + xaxim + húmus proporcionaram maior crescimento do sistema radicular.

Em trabalho desenvolvido por Rech Filho et al. (2005) observou-se 100% de sobrevivência, após nove semanas de cultivo, de mudas de *Vriesea reitzii* aclimatizadas em bandejas contendo substrato de casca de arroz e turfa (1:1) e mantidas em estufas.

A maioria das bromélias não requer altos níveis de fertilizantes. São plantas de crescimento lento, com metabolismo CAM e são consideradas muito eficientes em termos de absorção de nutrientes do ambiente e deposição de detritos em suas folhas e tanques. Na produção comercial, a utilização de substratos acrescidos com fertilizantes ou a distribuição de fertilizantes na superfície do substrato é uma prática comum, sendo que diferentes formulações devem ser utilizadas de acordo com o estágio de vida da planta: durante o crescimento vegetativo são recomendados níveis mais altos de nitrogênio, enquanto que durante o florescimento são requeridos níveis mais altos de fosfatos (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Produtores de bromélias geralmente diminuem a intensidade luminosa nas estufas utilizando diferentes tipos de sombrites. Intensidades luminosas altas ou baixas podem comprometer o desenvolvimento ou qualidade das bromélias, bem como influenciar a coloração das folhas: ambientes com baixa intensidade luminosa produzem folhas mais escuras e largas a fim de aumentar a absorção luminosa para a realização da fotossíntese, enquanto que ambientes mais claros tendem a produzir folhas menores, em tons amarelos e marrons para controlar a perda de água (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

2.5. Características morfo-anatômicas de plântulas e folhas

A descrição e estudo da morfo-anatomia de sementes e de partes das plântulas fornece base para várias áreas de estudos: paleobotânica, arqueologia, fitopatologia, estudo de comunidades vegetais, identificação e diferenciação de espécies, reconhecimento da planta no campo, taxonomia e na análise de sementes para agricultura e horticultura, cujos processos envolvem conhecimentos de fisiologia vegetal (GUNN, 1972; BRAVATO, 1974; BELTRATI, 1994). As sementes possuem características básicas para a identificação de famílias, gêneros ou até mesmo espécies e seu estudo é importante para o plantio de espécies e a produção de mudas visando à recuperação de áreas degradadas e à manutenção da biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2006).

O conhecimento da morfologia das sementes e do desenvolvimento pós-seminal contribui, ainda, para auxiliar análises de germinação e conservação de sementes (ANDRADE et al., 2003), uma vez que a emergência e o estabelecimento das plântulas são fases críticas no ciclo de vida das plantas (MELO et al., 2004), além de contribuir para a diferenciação de grupos taxonômicos (PEREIRA et al., 2008) e contribuir para o conhecimento global da espécie (PAOLI; BIANCONI, 2008).

Na família Bromeliaceae, estudos morfo-anatômicos de plântulas e sementes têm sido realizados. Mantovani e Iglesias (2005), trabalhando com *Aechmea nudicaulis*, *Neoregelia cruenta* (Bromelioideae) L. B. Smith e *Vriesea neoglutinosa* Mez (Tillandsioideae), estudaram as primeiras fases da vida destas plantas objetivando a compreensão do estabelecimento das mesmas em seu habitat natural levando em consideração o aparecimento de escamas em plântulas provenientes de sementes ou de reprodução assexuada. Os autores constataram que a germinação iniciou-se com a extrusão da radícula, cerca de três dias após a embebição, em todas as espécies, seguida da extrusão da plúmula e extensão da plúmula e extrusão da segunda folha, ao redor dos 15 dias. Nas plântulas provenientes de sementes, não foram detectadas escamas até 17 dias após a embebição. Já as plantas provenientes de rametes, apresentaram escamas com desenvolvimento completo nos primórdios foliares. Os autores inferem que esse fato acarreta em alta probabilidade de estabelecimento destas espécies por via vegetativa.

Scatena et al. (2006) descreveram o desenvolvimento pós-seminal de espécies de *Tillandsia* com o objetivo de compreender a propagação destas plantas e, assim, fornecer subsídios para seu cultivo comercial. Os autores verificaram que a germinação iniciou-se cerca de 20 dias após a embebição, com a extrusão do cotilédone haustorial. Com a emissão da segunda folha que sobrepõe à primeira folha, ocorre a formação de um pequeno tanque que acumula água e detritos. Não ocorre a emissão de catafilo ou raízes primárias.

Visando o fornecimento de informações para fins taxonômicos, ecológicos e de tecnologia de sementes, Pereira et al. (2008), realizaram a descrição morfo-anatômica do desenvolvimento pós-seminal de seis espécies de Bromeliaceae pertencentes às três subfamílias: *Pitcairnia encholirioides*, *Dyckia pseudococcinea* (subfamília Pitcairnioideae), *Vriesea heterostachys*, *Alcantarea imperialis* (subfamília Tillandsioideae), *Aechmea blanchetiana* e *Wittrockia gigantea* (subfamília Bromelioideae). Todas as espécies apresentam germinação epígea e plântulas criptocotiledonares. Os autores afirmam que os caracteres mais importantes encontrados

para fins de diferenciação de gêneros e subfamílias de Bromeliaceae são os apêndices seminais, a forma e tamanho da bainha cotiledonar, hipocótilo e raiz primária.

Silva (2009), com objetivos taxonômicos e para compreensão das adaptações das plantas ao hábito epífita, caracterizou o desenvolvimento pós-seminal de *Aechmea bromelifolia*, *A. castelnavii*, *A. mertensii* (Bromelioideae); *Dyckia duckei*, *D. paraensis*, *D. racemosa* (Pitcairnioideae); *Tillandsia adpressiflora*, *T. didistachae* e *T. paraensis*. A autora observou que todas as espécies apresentaram germinação epígea e desenvolvimento das plântulas criptocotiledonar. Os representantes das sub-famílias apresentam diferentes características seminais: mucilagem em Bromelioideae, alas membranáceas em Pitcairnioideae e apêndices plumosos em Tillandsioideae. As plantas da primeira e segunda sub-famílias iniciam a germinação com a extrusão da raiz primária enquanto que os representantes de Tillandsioideae o fazem com a extrusão do cotilédono.

Pereira et al. (2009), descreveram o comportamento germinativo de duas Bromeliaceae rupícolas, *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms e *Pitcairnia flammea* Lindl. e duas epífitas, *Vriesea heterostachys* (Baker) L. B. Sm. e *Vriesea penduliflora* L. B. Sm. buscando relacionar as características encontradas com a preferência pelos habitats epifítico ou rupestre.

Assim como a morfo-anatomia do desenvolvimento pós-seminal, estudos morfo-anatômicos de folhas de Bromeliaceae têm sido realizados com diferentes propósitos.

Silva (2009) trabalhou com *Aechmea bromeliifolia*, *A. castelnavii*, *A. mertensii* (Bromelioideae); *Dyckia duckei*, *D. paraensis*, *D. racemosa* (Pitcairnioideae); *Tillandsia adpressiflora*, *T. didistachae* e *T. paraensis* (Tillandsioideae) coletadas na região amazônica (MT), visando à caracterização anatômica foliar para contribuir com a taxonomia de Bromeliaceae e evidenciar estratégias adaptativas do grupo, uma vez que a adaptação de uma planta ao ambiente no qual se encontra pode acarretar em alterações importantes na morfologia interna e externa, sendo estas mais proeminentes nas folhas (SUTTER; HUTZELL, 1984). A autora encontrou características exclusivas em cada sub-família: as espécies de Pitcairnioideae apresentam células braciiformes isodiamétricas, as plantas de Bromelioideae apresentam células braciiformes estreladas, estômatos situados ao mesmo nível ou abaixo do nível da epiderme e mesófilo com fibras extravasculares e os representantes de Tillandsioideae têm células braciiformes alongadas e escamas distribuídas aleatoriamente.

Proença e Sajo (2007) estudaram as folhas de representantes das três subfamílias encontradas em remanescentes de cerrado do estado de São Paulo, como tentativa de

compreender as diversas adaptações existentes nos representantes de Bromeliaceae deste bioma. Os autores verificaram que em Bromelioideae os estômatos estão situados em nível abaixo da epiderme e a presença de parênquima aquífero, hipodermee canais de aeração. Em Pitcairnioideae, a estrutura das folhas é bem semelhante à da primeira subfamília, mas os estômatos encontram-se elevados com relação ao nível da epiderme. Em Tillandsioideae o mesofilo é mais compacto, as folhas são anfiestomáticas e densamente recobertas por escamas.

Também com o objetivo de compreender a adaptabilidade de bromélias, Gonzaga e Castro (2008) descreveram a anatomia foliar de *Tillandsia* spp verificando a presença de hipoderme mecânica e aquífera, epiderme unisseriada, escamas peltadas recobrando os estômatos, canais de aeração, feixes vasculares com fibras pericíclicas. Estas são características ditas xeromorfas e de adaptabilidade a ambientes com estresse de água e temperaturas elevadas.

Scatena e Segecin (2005) com objetivos de fornecer subsídios à taxonomia de *Tillandsia* que ocorrem nos Campos Gerais do Paraná e interpretar as adaptações destas plantas ao hábito epífita descreveram anatomicamente folhas de 12 representantes deste gênero, encontrando a presença de canais de ar, escamas recobrando estômatos, epiderme com corpos silicosos, parênquima aquífero e feixes vasculares colaterais, indicando a adaptação a ambientes xeromorfos. Além das características compartilhadas pelas espécies citadas e que se relacionam com o hábito das plantas, os autores também verificaram características exclusivas e de importância taxonômica para determinadas espécies, como o formato do limbo plano-convexo em *Tillandsia usneoides* L. e cutícula ornamentada e folhas anfiestomáticas em *Tillandsia streptocarpa* Baker.

Monteiro (2009) analisou folhas de 27 espécies de *Bromelia* com a finalidade de avaliar a relevância de características anatômicas para a taxonomia e filogenia do gênero, sendo que foram definidas características auxiliares na filogenia deste gênero. Dentre estas as mais importantes são: formato das células epidérmicas, espessamento da hipoderme mecânica, canais de ráfides, canais secretores, presença de grupo de fibras, formato das células do parênquima aquífero, dentre outras.

Com objetivos de produção e aperfeiçoamento da aclimatização, Barboza et al. (2006) e Batagin et al. (2009) analisaram folhas de plantas micropropagadas de variedades *Ananas comosus*. Estes autores verificaram que a estrutura básica das folhas de Bromeliaceae se mantém tanto *in vitro* quanto após a aclimatização, sendo que há algumas diferenças adaptativas, como menor frequência estomática e de escamas e

cutícula menos espessa *in vitro*, diferenças no formato e paredes das células da epiderme e do parênquima aquífero, bem como na distribuição e quantidade de fibras, evidenciando uma plasticidade fenotípica destas plantas em decorrência das características do ambiente no qual se encontram. Batagin et al. (2009), por exemplo, encontraram o mesmo número de estômatos em plantas *in vitro* e em plantas *ex vitro* cultivadas sob telado de 50% de sombreamento (33 estômatos.mm²), sendo maior nas plantas cultivadas a pleno sol (49 estômatos.mm²). Barboza et al. (2006) verificaram que as folhas de *Ananas comosus* são hipoestomáticas, independentemente do ambiente de cultivo mas encontraram diferença no número de estômatos, sendo 54 estômatos.mm² *in vitro* e 62 estômatos.mm² em casa de vegetação. Os autores verificaram que os estômatos estão dispostos longitudinalmente e apresentam câmara subestomática bem definida, característica descrita por diversos autores (AOYAMA; SAJO 2003; SCATENA; SEGECIN, 2005; SOUZA et al., 2005; BARBOZA et al., 2006). Essas adaptações não interferiram no processo de aclimatização e posterior sobrevivência das plântulas, indicando que não são necessárias etapas de rustificação das plântulas durante esse processo.

Arruda e Costa (2003) trabalharam com plantas de campo das espécies *Vriesea bituminosa*, *V. fosteriana*, *V. gigantea*, *V. longiscapa* e *V. triligulata*. Os autores encontraram a quantidade de escamas, na face adaxial, variando de 4,5 a 10,3, e de 13,8 a 20,9 na face abaxial, conforme a espécie. Os autores visualizaram uma organização dorso-ventral do mesofilo, com a presença de hipoderme adjacente à epiderme unisseriada, seguida de 3 a 7 camadas de parênquima aquífero. Da região mediana para a face abaxial observou-se a presença de parênquima clorofiliano, dividido em parênquima paliçádico e esponjoso, com a presença de ráfides nesse último. *V. bituminosa* e *V. gigantea* apresentaram estômatos em nível acima da epiderme, e *V. fosteriana*, *V. longiscapa* e *V. triligulata* apresentaram estômatos ao mesmo nível da epiderme.

Também há na literatura estudos foliares sob o ponto de vista fisiológico (BENZING, 1970). Este autor analisou a morfo-anatomia de escamas e da epiderme de espécies de *Aechmea*, *Billbergia* e *Neoregelia* e sua relação com a absorção foliar de zinco, fósforo, aminoácidos e nitrogênio em forma de amônia, sendo que há diferenças na morfo-anatomia (tamanho, formato de escamas, número de células do pedículo das escamas) entre as espécies e entre regiões da folha de uma mesma espécie, bem como nas taxas absorptivas dos elementos citados, em decorrência dessas características.

Nyman et al. (1987) estudaram a absorção ativa de aminoácidos pelas escamas de folhas de *Tillandsia paulifolia*. Os autores encontraram uma frequência de escamas de 4 a

5 por mm^{-2} . A utilização de aminoácidos indicou que as células vivas do pedículo da escama são capazes de absorver aminoácidos livres de solução extrafoliar, como leucina, lisina, arginina e asparagina.

Para bromélias do gênero *Vriesea*, poucos estudos neste sentido foram realizados relacionados à morfo-anatomia do desenvolvimento pós-seminal (MANTOVANI; IGLESIAS, 2005; PEREIRA et al., 2008) e morfo-anatomia de folhas (ARRUDA; COSTA, 2003; PROENÇA; SAJO, 2007), sendo necessário um maior aprofundamento nestas questões o que permitirá o conhecimento mais amplo e aprofundado das espécies desse gênero.

3. OBJETIVOS

Com base no contexto apresentado, este estudo visou ampliar o conhecimento global e de propagação das espécies do gênero *Vriesea* com elevado potencial ornamental tanto para o mercado interno como externo, assim como de importância fundamental aos ecossistemas tropicais.

Os objetivos específicos no desenvolvimento deste trabalho foram:

- a) Avaliar o processo de germinação de quatro espécies de *Vriesea*: *V. carinata*, *V. paraibica*, *V. friburgensis* e *V. simplex in vitro*, sob três condições de temperatura (22 °C, 27 °C e 32 °C) e em casa de vegetação sob temperatura ambiente;
- b) Realizar a descrição morfo-anatômica do desenvolvimento inicial de plântulas de *V. carinata*, *V. paraibica*, *V. friburgensis* e *V. simplex*;
- c) Formular um meio de cultura mais adequado para *V. carinata*, *V. paraibica*, *V. friburgensis*, *V. hieroglyphica* e *V. simplex*, com base em exigências nutricionais de espécies deste gênero, visando melhoria no crescimento *in vitro* das plântulas;
- d) Avaliar a taxa de sobrevivência durante o processo de aclimatização de plântulas germinadas e cultivadas *in vitro* de *V. carinata*, *V. paraibica*, *V. friburgensis* e *V. simplex* em três diferentes substratos comerciais e, ao mesmo tempo, verificar a influência da presença ou ausência de AIB no meio de cultura anteriormente à aclimatização, no enraizamento e sobrevivência das plântulas após a transferência para o ambiente *ex vitro*;
- e) Comparar características anatômicas e morfológicas de folhas das espécies *V. carinata*, *V. paraibica*, *V. friburgensis* e *V. simplex* cultivadas *in vitro* e *ex vitro* visando à melhor compreensão da plasticidade fenotípica dessas espécies e a adaptação a diferentes ambientes, além de verificar se as referidas estruturas influenciam no processo e/ou sucesso de aclimatização;
- f) Introdução *in vitro* de quatro espécies de *Vriesea*: *Vriesea carinata*, *V. paraibica*, *V. phillipo-coburgii*; *V. simplex* e *Aechmea nudicaulis* a partir de explante somáticos (ápice caulinar), objetivando estabelecer um protocolo de clonagem das mesmas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As espécies de *Vriesea* estudadas neste trabalho (Figura 1) e algumas características das mesmas, segundo Martinelli et al. (2008) são:

- *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. var. *nudicaulis* Fl. Brit. W. I. 593. 1864. Apresenta condição vulnerável no Rio Grande do Sul (2002), sendo de ocorrência nos estados PB, PE, MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS e encontrada nos corredores central, da Serra do Mar e do Nordeste da Mata Atlântica.

- *Vriesea carinata* Wawra var. *carinata* Oesterr. Bot. Z. 12: 349. 1862. Apresenta condição vulnerável no Rio Grande do Sul (2002), sendo de ocorrência nos estados BA, MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS e encontrada nos corredores central e da Serra do Mar da Mata Atlântica.

- *Vriesea friburgensis* Mez var. *friburgensis* Fl. bras. 3(3): 537. 1894, sendo de ocorrência nos estados PE, BA, MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS e encontrada nos corredores central e da Serra do Mar da Mata Atlântica.

- *Vriesea hieroglyphica* (Carrière) E. Morren Ill. var. *hieroglyphica*. Hort. 31: 41. 1884. Apresenta condição crítica no Brasil (2005) e no Espírito Santo (2005), sendo de ocorrência nos estados ES, RJ, SP, PR e encontrada nos corredores central e da Serra do Mar da Mata Atlântica.

- *Vriesea paraibica* Wawra Itin. Prin. S. Coburgi 1: 160. 1883, sendo de ocorrência nos estados RJ, MG e encontrada no Corredor da Serra do Mar da Mata Atlântica.

- *Vriesea philippocoburgii* Wawra Oesterr. Bot. Z. 30: 219. 1880. Apresenta condição vulnerável no Rio Grande do Sul (2002), sendo de ocorrência nos estados RJ, SP, PR, e encontrada no Corredor da Serra do Mar da Mata Atlântica.

- *Vriesea simplex* (Vell.) Beer Fam. Bromel. 97. 1856, sendo de ocorrência nos estados BA, ES, RJ, SP, e encontrada nos corredores central e da Serra do Mar da Mata Atlântica.

Os organogramas a seguir (Figuras 2 e 3) apresentam as atividades experimentais realizadas no presente estudo, contando com dois grupos de espécies de Bromeliaceae.

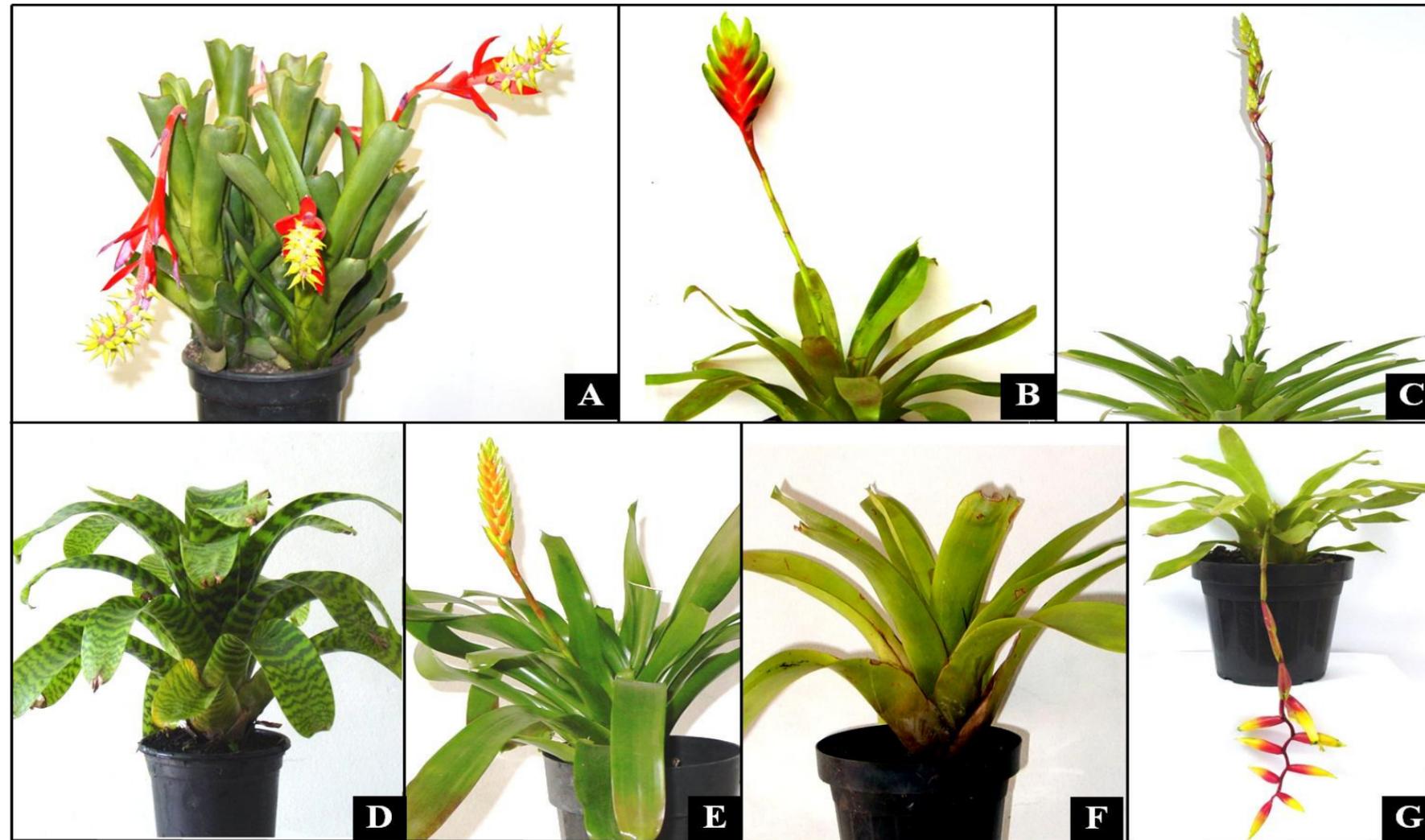


Figura 1 - Plantas adultas das espécies de Bromeliaceae utilizadas no presente estudo: *Aechmea nudicaulis* (A); *Vriesea carinata* (B); *V. friburgensis* (C); *V. hieroglyphica* (D); *V. paraibica* (E); *V. philipo-coburgii* (F) e *V. simplex* (G). (Fotos de Everton Hilo de Souza)

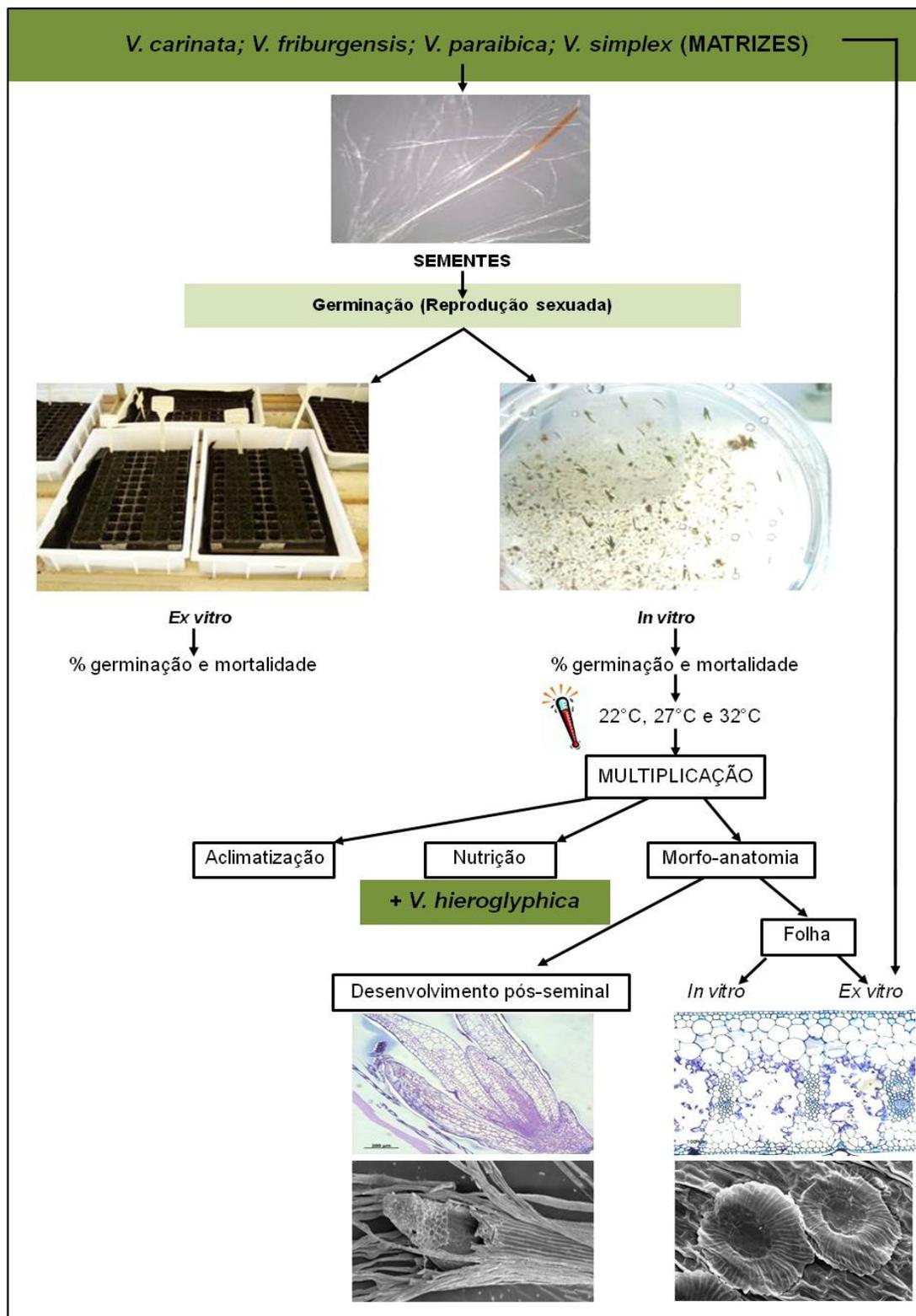


Figura 2 - Organograma representando os experimentos realizados com *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica*, *V. simplex* e *V. hieroglyphica* a partir de sementes e plântulas provenientes das mesmas

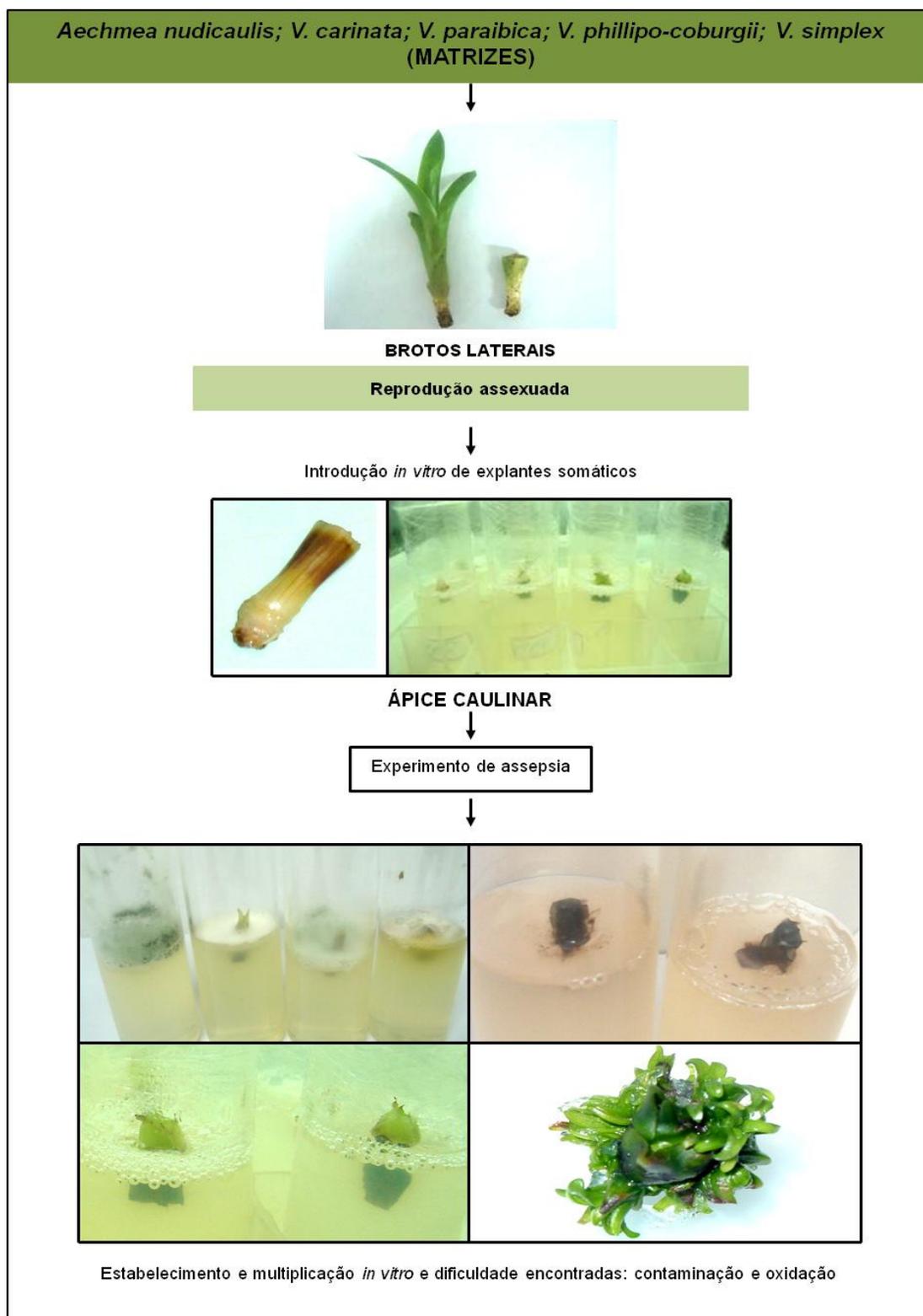


Figura 3 - Organograma representando os experimentos realizados com *Vriesea carinata*, *V. paraibica*, *V. simplex*, *V. phillipo-coburgii* e *Aechmea nudicaulis* a partir de brotos laterais provenientes das plantas matrizes

4.1. Estudos da germinação de sementes de quatro espécies de *Vriesea* em casa de vegetação e *in vitro*

4.1.1. Material Vegetal

Cápsulas recém colhidas com sementes de *V. carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex*, foram disponibilizadas pela Dra. Alice N. Aranda-Peres, pós-doutoranda no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP, para os estudos da germinação e do desenvolvimento das plântulas.

4.1.2. Germinação *ex vitro*

Sementes das quatro espécies de *Vriesea* foram introduzidas em bandejas com células de fundo perfurado. O substrato utilizado foi o Plantmax[®]. No momento da sementeira, as sementes foram depositadas na superfície do substrato. O experimento foi instalado em temperatura ambiente em casa de vegetação. Todos os tratamentos foram expostos às mesmas condições de umidade, temperatura e luminosidade. As bandejas com as sementes foram colocadas em bandejas maiores contendo um tecido mantido constantemente úmido para prevenir excesso de água (Figura 4). Assim, o substrato foi mantido úmido por capilaridade.



Figura 4 - Bandejas contendo substrato Plantmax[®], em casa de vegetação, no qual as sementes de *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex* foram semeadas

As avaliações foram realizadas a cada 20 dias, entre 40 e 120 dias após sementeira, totalizando cinco avaliações, determinando-se a porcentagem de germinação e, posteriormente, de mortalidade das plântulas recém-germinadas. O delineamento

experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições sendo que cada repetição se constitui de 12 células com 35 sementes, totalizando 175 sementes por espécie. As médias das percentagens de germinação e de mortalidade das sementes das espécies foram comparadas pelos teste de Tukey a 1% de probabilidade. Os dados qualitativos de germinação e, posteriormente, sobrevivência das plântulas recém germinadas foram submetidos à análise de regressão. Os dados foram transformados para $\text{arc sen}(\sqrt{x/100})$ antes da análise estatística.

4.1.3. Germinação *in vitro* das sementes de quatro espécies de *Vriesea*

As sementes obtidas apresentam apêndice plumoso que foram retirados com bisturi para facilitar o manuseio e diminuir o risco de contaminação *in vitro* (ARANDA-PERES, 2005).

Para a assepsia, as sementes foram imersas em etanol (70%), ficando sob agitação por 2 minutos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (70% produto comercial Q-Boa, 2,5% cloro ativo) durante 25 minutos e de três lavagens em água esterilizada, em fluxo laminar. Em seguida, sob condições assépticas, as sementes foram introduzidas em meio de cultura contendo $\frac{1}{4}$ dos macronutrientes de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com os micronutrientes MS e acrescido de 10 mL L^{-1} de água de coco e 60 g L^{-1} de extrato de banana (KERBAUY, 1984), 20 g L^{-1} de sacarose, vitaminas de MS, $10 \mu\text{M GA}_3$ e solidificado com ágar (8 g L^{-1}), conforme Aranda-Peres (2005). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8, anteriormente à autoclavagem e o meio vertido em placas de Petri. A autoclavagem foi realizada por 20 minutos, à 120°C e 1 atm de pressão. Os testes de germinação foram realizados em câmaras de germinação tipo B.O.D. com temperatura controlada de 22°C , 27°C e 32°C , sendo 27°C considerado o controle do experimento. O fotoperíodo em todos os tratamentos foi de 16 horas e a intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As avaliações, no total de seis, foram realizadas semanalmente determinando-se a porcentagem de germinação e, posteriormente, de mortalidade das plântulas recém germinadas *in vitro*, considerando-se como semente germinada aquela que apresentou a primeira folha. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3 (espécies x temperaturas) com 5 repetições por espécie por tratamento, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 35 sementes

As médias das porcentagens de germinação e de mortalidade das sementes das espécies nas diferentes temperaturas foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% de

probabilidade, e posteriormente a sobrevivência das plântulas recém germinadas foram submetidos à análise de regressão. Os dados foram transformados para $\text{arc sen}(\sqrt{x/100})$ antes da análise estatística.

4.1.3.1 Cultivo *in vitro*

Plântulas germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1 cm de altura foram transferidos para frascos contendo meio de cultura M4 (ARANDA-PERES et al., 2009), acrescido de vitaminas MS, 20 g L⁻¹ sacarose, 8 g L⁻¹ ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As culturas foram transferidas para meio novo a cada três semanas (com concentrações crescentes de BAP: 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 1,5 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹) e mantidas em sala de crescimento a 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade de luz de 40 μmol m⁻² s⁻¹, até a obtenção de plantas suficientes para realização do experimento de ajuste mineral do meio de cultura e para o experimento de aclimatização.

4.2. Análise morfoanatômica do desenvolvimento de plântulas de espécies de *Vriesea*

Para descrição do processo de germinação e do desenvolvimento pós-seminal nas espécies em estudo, três amostras foram coletadas por espécie, em diferentes fases de desenvolvimento da germinação *in vitro* (item 4.1.2), foram processadas conforme descrito a seguir.

As diferentes fases foram estabelecidas conforme trabalhos prévios (PEREIRA et al., 2008; SCATENA et al., 2006; SILVA, 2009). O início da germinação foi considerado quando, em lupa, foi possível a visualização da emergência da raiz primária rudimentar.

4.2.1 Análises microscópicas

Amostras foram coletadas para análises anatômicas e da morfologia externa através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Para tanto, as amostras foram selecionadas e colocadas em solução de Karnovsky modificada composta de glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), cloreto de cálcio (5 mM) em tampão cacodilato de sódio (0,05M, pH 7,2), sob vácuo (60 mmHg) por 30 minutos e posteriormente sob refrigeração por 24 horas. Em seguida as amostras foram desidratadas em série etílica crescente em água (35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%).

4.2.1.1 Microscopia de luz (ML)

As amostras desidratadas foram processadas para infiltração em historesina (Leica) conforme o seguinte protocolo:

- a. Transferência para propanol e em seguida butanol, ambos a 100%, durante 2 horas cada, sob refrigeração;
- b. Infiltração em solução crescente de butanol: meio de infiltração (1:3, 1:1, 3:1) até as amostras afundarem, seguida de infiltração em meio de infiltração (100 %). Todas as etapas foram realizadas sob refrigeração por 24 a 48 horas;
- c. Emblocagem em historesina conforme instruções do fabricante, com polimerização à temperatura ambiente;
- d. Realização dos cortes histológicos em micrótomo rotativo (5 μ m). Deposição dos cortes em lâminas histológicas contendo água filtrada. Secagem sobre chapa aquecedora (40 °C);
- e. Coloração dos cortes em azul de toluidina (0,1 %) e secagem à temperatura ambiente;
- f. Montagem dos cortes histológicos em entellan® coberto com lamínula para tornar as lâminas permanentes;
- g. Análise em microscópio de luz transmitida Zeiss Axioscop 2, no NAP/MEPA, ESALQ/USP e obtenção das micrografias digitais.

4.2.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras desidratadas foram processadas para observação em MEV conforme o seguinte protocolo:

- a. Secagem ao ponto crítico através de CO₂ em aparelho CPD 030 Balzers;
- b. Montagem em suportes metálicos;
- c. Metalização com ouro (60 nm) em evaporador MED 010 Balzers;
- d. Observação e captura de imagens digitais em microscópio eletrônico de varredura Zeiss Leo 435-VP, no NAP/MEPA, ESALQ/USP.

4.3. Ajuste mineral do meio de cultura

4.3.1. Material vegetal

Plântulas de tamanho uniforme (aproximadamente 3 cm e 0,5 g de matéria fresca) germinadas *in vitro* conforme descrito no item 4.1.3. foram selecionadas e utilizadas para ajuste do meio de cultura às mesmas, reduzindo os níveis de nitrogênio e ferro e aumentando os níveis de magnésio e cobre do meio de cultura, conforme sugerido por Aranda-Peres et al. (2009). As espécies utilizadas para realização do experimento foram *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica*, *V. simplex* e *V. hieroglyphica*, sendo esta última escolhida para comparação com os resultados obtidos por Aranda-Peres et al. (2009), por ter apresentado neste trabalho um desempenho inferior às demais espécies utilizadas (*Vriesea friburgensis* e *V. unilateralis*).

4.3.2. Meios de cultura

O meio base escolhido (Tabela 1) foi o M4 (ARANDA-PERES et al., 2009). A dose de nitrogênio usualmente recomendada (EPSTEIN; BLOOM, 2005) é de 210 mg L⁻¹. Partindo deste valor, foram propostas outras duas doses: 112 e 336 mg L⁻¹, sendo que no meio M4 a concentração de N é de 419 mg L⁻¹. Em todas as doses de N empregadas a proporção de 70% de NO₃⁻ : 30% de NH₄⁺ foi mantida. As doses de magnésio foram de 18, 36 (dose utilizada no meio M4) e 54 mg L⁻¹. As doses de Cu e Fe foram fixadas em 0,032 mg L⁻¹ e 3 mg L⁻¹ respectivamente, segundo as recomendações de Aranda-Peres et al. (2009) e Epstein

e Bloom (2005), totalizando 9 tratamentos por espécie (Tabela 2) (combinações das três doses de nitrogênio com as três doses de magnésio e as doses fixas de Cu e Fe em todos os meios). As concentrações dos demais nutrientes foram mantidas conforme o meio M4 (ARANDA-PERES et al., 2009). Os controles foram constituídos do meio M4 (C1) e do meio M4 com as doses de Cu e Fe utilizadas no experimento (C2). Os meios foram suplementados com vitaminas MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, ágar (8g L⁻¹) e BAP (0,5 mg L⁻¹). O meio teve o pH ajustado para 5,8 utilizando soluções de HCl ou NaOH e depois vertido em frascos tipo “azeitona”, 45 mL por frasco, sendo em seguida autoclavados a 120°C, durante 20 minutos a 1 atm.

Tabela 1 - Composição mineral do meio de cultura M4 (ARANDA-PERES et al., 2009)

Meio M4			
Macronutrientes (mg L ⁻¹)		Micronutrientes (mg L ⁻¹)	
N	419	Fe	3,73
P	19	Cu	0,012
K	390	Zn	1,952
Ca	480	Mn	5,49
Mg	36	B	1,078
S	54	Cl	355

Tabela 2 - Doses de nitrogênio, magnésio, cobre e ferro utilizadas como alterações propostas ao meio M4 para o cultivo de cinco espécies de *Vriesea*

Tratamento	N	Mg	Cu	Fe
mg L ⁻¹				
1	112,00	18,00	0,032	3,00
2	112,00	36,00	0,032	3,00
3	112,00	54,00	0,032	3,00
4	210,00	18,00	0,032	3,00
5	210,00	36,00	0,032	3,00
6	210,00	54,00	0,032	3,00
7	336,00	18,00	0,032	3,00
8	336,00	36,00	0,032	3,00
9	336,00	54,00	0,032	3,00
C1 (M4)	419,00	36,00	0,012	3,73
C2	419,00	36,00	0,032	3,00

Foram realizadas cinco repetições por espécie, por tratamento, sendo que cada repetição foi composta por um frasco com 6 plântulas. Todas as culturas foram mantidas a 26 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade de luz de 40 μmol m⁻² s⁻¹. As culturas foram

transferidas para meio fresco a cada três semanas e o experimento foi avaliado após 12 semanas (quatro subcultivos), por meio de avaliações de massa de matérias fresca e seca e análises químicas das folhas. Nos subcultivos, os brotos, sem serem individualizados, foram transferidos para meio fresco, de mesma composição.

4.3.3. Massa de matéria fresca e seca

Para as análises de massa de matéria fresca e seca foram utilizados três frascos com seis “tufos” de plantas cada, sendo cada frasco considerado uma repetição. As plantas retiradas do frasco de meio de cultura foram inicialmente mergulhadas em água destilada para retirada do meio de cultura. Após o enxágüe as plantas advindas de um mesmo frasco (uma repetição) foram depositadas sobre papel filtro para retirada do excesso de água e pesadas em balança analítica, obtendo-se a massa fresca total. Foram pesadas três repetições compostas de 6 plantas cada, por tratamento. As plântulas utilizadas para massa fresca foram posteriormente acondicionadas, também de 6 em 6, em sacos de papel kraft e secas em estufas dotadas de sistema para circulação forçada e renovação de ar, a uma temperatura de 70°C, por 72 horas ou até atingir peso constante. Após o processo de secagem, o material foi mantido em dessecador, contendo sílica gel, para evitar a reidratação da amostra. Foram pesadas três repetições compostas de seis plantas cada, por tratamento, para obtenção da massa seca total.

4.3.4. Análises químicas

Após a determinação das massas fresca e seca, 0,05 g do material vegetal por repetição de cada tratamento foi triturado manualmente e submetido às análises químicas.

O nitrogênio foi determinado por método semimicro Kjeldahl após digestão sulfúrica. Para os demais nutrientes, fez-se a digestão nítrico-perclórica e quantificação por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio (ICP-AES) (MALAVOLTA et al., 1997).

4.3.5 Análise estatística

O delineamento estatístico experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 x 5 (doses de nitrogênio x doses de magnésio x espécies). As medidas

de massa de matéria seca e massa de matéria fresca foram submetidas à análise de variância e posteriormente, em função do nível de significância, à análise de teste de Scott-Knott, ao nível de 15% de probabilidade por meio do programa SAS (2004). Para as doses de nitrogênio e magnésio procedeu-se ao estudo de regressão polinomial (superfície de resposta) por meio do comando RSREG.

4.4. Aclimatização

4.4.1. Material vegetal e meios de cultura anteriores à aclimatização

Plantas provenientes do cultivo *in vitro* (item 4.1.3.1.) foram transferidas para frascos com mesmo meio descrito no referido item sem regulador de crescimento, nos quais ficaram por aproximadamente dois meses com uma troca de meio nesse período. Após esse período, metade das plantas permaneceu em meio sem nenhum regulador de crescimento e a outra metade foi transferida para o mesmo meio acrescido de 1,5 mg L⁻¹ de AIB, para enraizamento. As plantas ficaram sob estas condições durante 3 meses com subcultivos para meio novo a cada 3 semanas.

4.4.2. Transferência das plântulas para bandejas

Posteriormente, as plantas dos dois tratamentos (com e sem AIB) foram retiradas dos frascos com auxílio de pinça, lavadas com água para retirada de resíduos de meio de cultura entre as raízes e plantadas em bandejas de 14 x 7 células, contendo substratos Bioplant® (composto de fibra de côco e vermiculita expandida), Tropstrato HA® (composto de casca de pinus, carvão vegetal, vermiculita, nitrato de amônio e nitrato de potássio) e Vivatto® (composto de casca de pinus, vermiculita, moinha de carvão vegetal e espuma fenólica) (Figura 5). As bandejas foram alocadas em casa de vegetação comercial com alta umidade relativa e temperatura ambiente, adaptada a receber mudas de plantas. A irrigação foi realizada manualmente, por aspersão, três vezes ao dia.

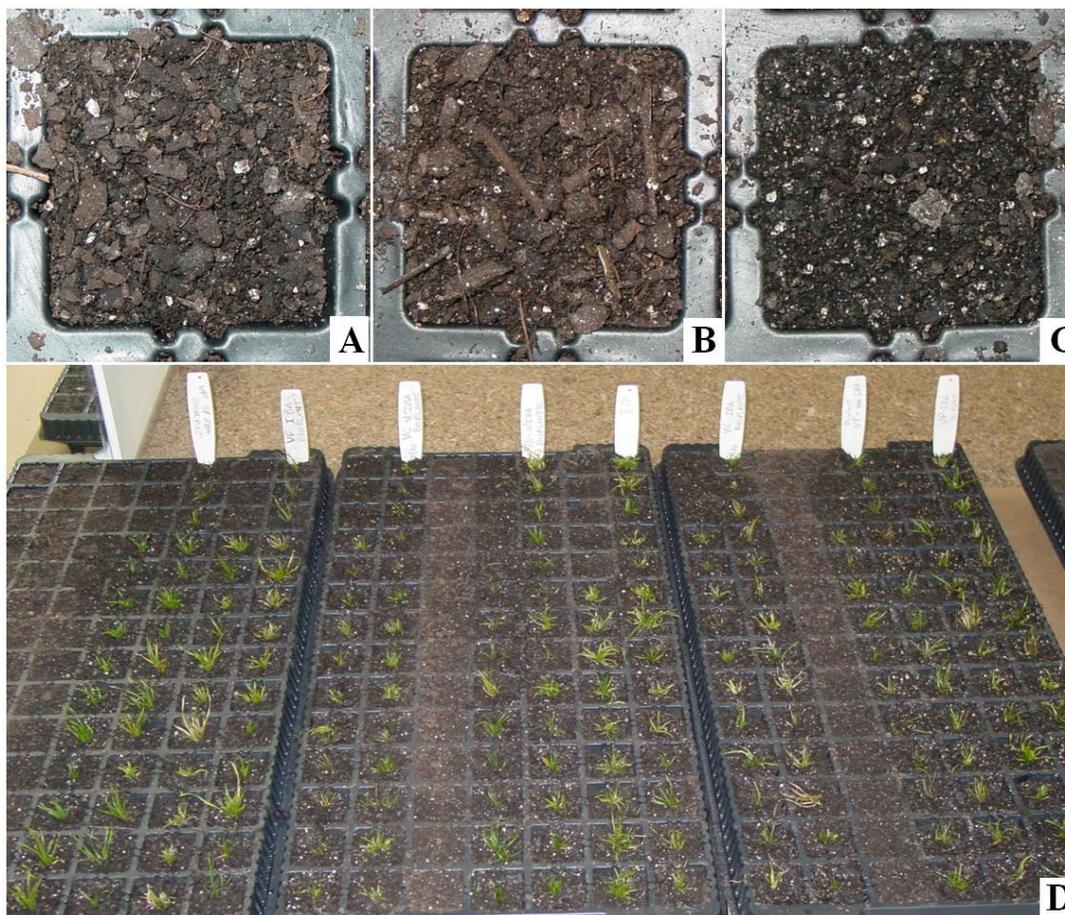


Figura 5 - Substratos testados no experimento de aclimatização, Bioplant® (A), Tropstrato HA® (B) e Vivatto® (C) e plântulas transferidas para o processo de aclimatização (D)

4.4.3. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo $2 \times 3 \times 4$ (tratamento/ausência de hormônio AIB x substratos x espécies), com 25 repetições, sendo que cada repetição é composta por uma planta, totalizando 150 plantas por espécie.

O experimento foi avaliado pela taxa de sobrevivência ao final do período estudado, que corresponde a 120 dias após a transferência das plântulas para as bandejas.

4.5. Análise morfo-anatômica de folhas de *Vriesea*

4.5.1. Material Vegetal

Amostras de folhas de cinco diferentes plantas provenientes de sementes germinadas *in vitro* de *V. carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex* com cerca de um ano e meio e amostras de folhas de cinco diferentes plantas adultas cultivadas em casa de vegetação escolhidas aleatoriamente, foram coletadas. Em ambos os casos, a amostra submetida às análises corresponde às regiões do terço mediano da folha D. A folha D é a metabolicamente mais ativa por ser a mais jovem dentre as folhas adultas. Forma um ângulo de 45° entre o nível de solo e um eixo imaginário que passa pelo centro da planta e é fácil de ser destacada da planta (CUNHA et al., 1999). As amostras foram processadas conforme descrição nos itens 4.2.1.1 e 4.2.1.2 para análise morfo-anatômica.

4.5.2. Determinação do número de estômatos e escamas (tricomas escamiformes)

O número de estômatos e escamas por mm² foi determinado através da contagem dos mesmos em cinco campos escolhidos aleatoriamente de micrografias obtidas em microscopia eletrônica de varredura em aumento de 100X. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 4 (face da folha x condição de cultivo x espécie), com cinco repetições cada, sendo cada repetição constituída de uma contagem. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e utilizou-se o teste de Tukey em nível de 5% de significância.

4.6. Introdução *in vitro* de espécies de Bromeliaceae a partir de ápices caulinares

4.6.1. Material vegetal

Foram utilizados ápices caulinares, de cerca de 3 cm de comprimento, de brotos laterais advindos de plantas matrizes de *Aechmea nudicaulis*, *Vriesea carinata*, *V. paraibica*, *V. phillipo-coburgii*, e *V. simplex* cultivadas em casa de vegetação em vasos plásticos com 13 cm de altura por 10 cm de diâmetro em substrato Baseplant®. Em todos os tratamentos e, posteriormente, no experimento propriamente dito as plantas matrizes foram tratadas com Agrimicina (1%) por três vezes, com intervalos de uma semana entre as aplicações.

4.6.2. Assepsia e introdução *in vitro*

Foram realizados ensaios preliminares testando oito tratamentos de assepsia, anteriormente ao experimento propriamente dito, com ápices caulinares de brotos laterais de *Aechmea nudicaulis* pela disponibilidade de plantas e explantes, visto que esta espécie apresenta desenvolvimento mais rápido do que espécies do gênero *Vriesea*. Esses ensaios foram baseados em Guerra e Dal Vesco (2010), Nakano (2008), e Rodrigues (2010) (informação verbal)¹.

Uma semana após a última aplicação de Agrimicina, brotos laterais foram retirados das plantas matrizes, retirando-se as folhas externas, sendo que os explantes, nesta fase, tinham cerca de 2 cm de comprimento. Em seguida, foram lavados em água corrente e detergente durante um minuto sob agitação e colocados sob água corrente durante cinco minutos. Esse processo de lavagem foi realizado duas vezes. Em câmara de fluxo laminar, os ápices tiveram seu tamanho reduzido para cerca de 0,70 cm com auxílio de pinça e bisturi flambados e foram então colocados individualmente em frascos de vidro previamente autoclavados e envoltos em papel alumínio, visando diminuir a oxidação. Após isso, foram imersos em etanol (70%) por um ou três minutos e em solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa, 2,5 % de cloro ativo) por 30 minutos.

Após a imersão em solução de hipoclorito de sódio, os ápices foram lavados três vezes com água destilada estéril. Nos tratamentos 1 a 6, os ápices foram introduzidos em solução de cefotaxima (100 mg L⁻¹) durante 24 horas, sob agitação a 100 rpm, no escuro, antes da introdução no meio de cultura, conforme descrito na Tabela 3.

¹ Informação fornecida por P. H. V. Rodrigues, Esalq/USP em 2010

Tabela 3 - Descrição dos tratamentos preliminares de assepsia em ápices vegetativos de *Aechmea nudicaulis* cujos resultados implicaram na definição do experimento final de assepsia para as espécies de *Vriesea*

Tratamento	Etanol 70%	Hipoclorito	Meio	Resultados
1	1 minuto, sem Tween 20	70% no sonicador	Líquido + 250 mg L ⁻¹ de cefotaxima sódica	100% de contaminação
2	1 minuto, sem Tween 20	70% no sonicador	Sólido + 250 mg L ⁻¹ de cefotaxima sódica	(70% bacteriana e 30% fúngica)
3	1 minuto, sem Tween 20	80% no sonicador	Líquido + 250 mg L ⁻¹ de cefotaxima sódica	100% de contaminação
4	1 minuto, sem Tween 20	80% no sonicador	Sólido + 250 mg L ⁻¹ de cefotaxima sódica	(50% bacteriana e 50% fúngica)
5	1 minuto, sem Tween 20	90% no sonicador	Líquido + 250 mg L ⁻¹ de cefotaxima sódica	90% de contaminação
6	1 minuto, sem Tween 20	90% no sonicador	Sólido + 250 mg L ⁻¹ de cefotaxima sódica	(80% bacteriana e 10% fúngica) e 10% de oxidação
7	3 minutos com 3 gotas de Tween 20	50% sem sonicador	Sólido + 2 mL de óleo fúsel*	90% de contaminação (40% bacteriana e 50% fúngica) e 10% de oxidação
8	3 minutos com 3 gotas de Tween 20	50% sem sonicador	Sólido + 500 mg L ⁻¹ de cefotaxima sódica	60% de contaminação (30% bacteriana e 30% fúngica), 10% de oxidação e 30% de ápices sadios
Experimento	3 minutos com 3 gotas de Tween 20	50% sem sonicador	Sólido + 600 mg L ⁻¹ de cefotaxima sódica	Descritos no item Resultados e Discussão

*Segundo Alves e Teixeira (2009) e Pérez et al. (2001) o óleo fúsel, mais popularmente conhecido como óleo de cana, faz parte de uma gama de subprodutos gerados através do processamento da cana de açúcar. É um líquido de coloração amarelada obtido a partir da destilação da cachaça ou do álcool etílico, constituindo a fração menos volátil produzida durante este processo (PÉREZ et al., 2001). Algumas usinas comercializam este subproduto para indústrias de cosméticos e de medicamentos, porém a grande maioria vê o óleo como um resíduo de descarte. Existem relatos de que o óleo fúsel tem possibilidades de uso como inseticida e herbicida em doses acima de 20%. O maior constituinte do óleo fúsel, é o álcool isoamílico.

Em todos os tratamentos, após assepsia os ápices foram introduzidos em meio M4 (ARANDA-PERES et al., 2009), suplementado com vitaminas MS, 8g.L⁻¹ de ágar (no meio sólido), 20 g L⁻¹ de sacarose, 2 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA, com óleo fúsel ou antibiótico, no meio líquido (Tabela 3, tratamentos 1, 3 e 5) ou sólido (nos demais tratamentos). Durante 10 dias os ápices ficaram no escuro e após esse período foram

transferidos para sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade de luz de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

A partir dos resultados obtidos com os ensaios preliminares, delineou-se um experimento com ápices caulinares de brotos laterais, totalizando 16 ápices de *V. carinata*, 10 de *V. paraibica*, 15 de *V. philipo-coburgii*, 16 de *V. simplex* e 10 de *A. nudicaulis*. Esta última espécie foi mantida para efeito de comparação com as espécies de *Vriesea*. O protocolo de assepsia utilizado foi o mesmo descrito no tratamento 8, por este ter se mostrado mais eficiente, com a diferença de maior concentração de cefotaxima sódica utilizada no meio de cultura no experimento (600 mg L^{-1}). Os ápices foram introduzidos no meio de cultura, seguindo as mesmas condições de luminosidade e temperatura. Após a etapa de estabelecimento e regeneração dos ápices, estes foram transferidos para meio de multiplicação composto por sais do M4 (ARANDA-PERES et al., 2009) suplementado com vitaminas do MS, 8 g L^{-1} de ágar, 20 g L^{-1} de sacarose e 2 mg L^{-1} de BAP.

O experimento foi avaliado aos 10 e 30 dias após a introdução *in vitro* dos ápices, sendo que foram analisadas as porcentagens de contaminação bacteriana e fúngica, de oxidação seguida de necrose, de ápices sadios.

Os ápices sadios foram acompanhados sendo analisado o número de brotos aos 4, 10 e 14 meses, após a introdução *in vitro*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos da germinação de sementes de quatro espécies de *Vriesea* *ex vitro* e *in vitro*

A germinação ocorreu em ambas as condições de cultivo: em casa de vegetação, sob temperatura ambiente em todas as espécies e *in vitro*, sob as três temperaturas, observando-se diferenças entre as espécies.

5.1.1. Germinação de sementes de quatro espécies de *Vriesea* em casa de vegetação

Nas condições *ex vitro*, as observações foram realizadas a partir do 40º dia, pois nessas condições a germinação é mais lenta e a observação do início da germinação é dificultada pois as sementes estão encobertas pelo substrato. A porcentagem de germinação variou conforme a espécie, com valores entre 5,14 e 66,85 %. Nenhuma semente germinou após o 80º dia depois da sementeira (Figura 6), sendo o crescimento das plântulas em casa de vegetação bastante lento. Para todas as espécies, o maior número de plântulas é encontrado aos 60 dias após a sementeira quando se observou um decréscimo no número de plântulas ao longo do tempo, com elevada mortalidade de plântulas recém-germinadas em todas as espécies, observando-se que, aos 120 dias, esse valor variando de 61,40 a 92,00 % do total de sementes com plântulas desenvolvidas (Figura 6). Na análise de regressão, o modelo quadrático foi o que melhor se ajustou aos dados de sobrevivência das plântulas.

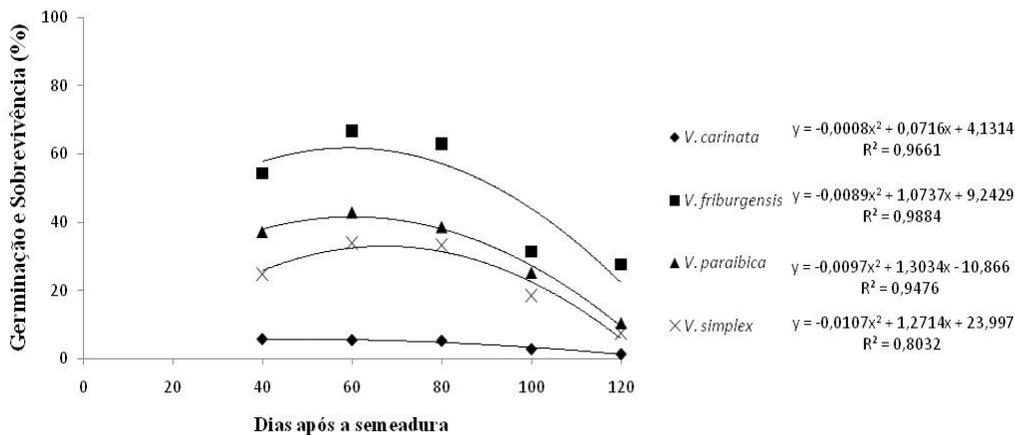


Figura 6 - Germinação e sobrevivência das sementes de *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex* no período de 40 a 120 dias após sementeira em bandejas contendo substrato Plantmax® e mantidas em casa de vegetação

As espécies apresentaram taxas de germinação *ex vitro* significativamente diferentes umas das outras, sendo que a maior taxa de germinação foi observada para *V. friburgensis* e a menor para *V. carinata*. As taxas de mortalidade de plântulas das diferentes espécies não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem de germinação das sementes e mortalidade de plântulas de *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex*, cultivadas em bandejas com substrato Plantmax® em casa de vegetação aos 120 dias após a semeadura.

Espécies	Germinação (%)	Mortalidade (%)
<i>V. carinata</i>	5.14 c	92.00 a
<i>V. friburgensis</i>	66.85 a	61.40 a
<i>V. paraibica</i>	42.85 ab	84.10 a
<i>V. simplex</i>	32.57 b	75.26 a
CV (%)	34.41	25.23

Médias acompanhadas de mesma letra não apresentam diferença significativa comparadas nas colunas a 1% pelo Teste de Tukey de comparação de médias.

As taxas de mortalidade das plântulas recém-germinadas cultivadas em casa de vegetação foram altíssimas, sendo superiores a 60%. Winkler et al. (2005) sugerem que apesar das sementes das epífitas, pelo pequeno tamanho, apresentarem vantagem em relação à dispersão, associado à produção de um maior número de sementes, aumentando as chances de sucesso na germinação, as sementes pequenas têm poucos nutrientes para o desenvolvimento das plântulas. Assim, a mortalidade de plântulas pode ser associada ao grande investimento em aparato de dispersão, que no caso das espécies de *Vriesea* estudadas se constitui de apêndice plumoso, e menor energia dispendida para acúmulo de nutrientes para a plântula (WINKLER et al., 2005). Segundo Harper (1977), a germinação e desenvolvimento da plântula são as fases mais críticas no ciclo de vida das plantas devido à alta mortalidade observada. Winkler et al. (2005) afirma que a mortalidade das plântulas, e não a germinação, é o fator determinante na distribuição das bromélias epífitas em seu habitat natural.

Em estudo de Anacleto (2005), o início da germinação de *A. nudicaulis* em condições *ex vitro* ocorreu entre o 4º e o 8º dia de monitoramento e o ponto máximo de germinação foi registrado no 20º dia em diferentes substratos, confirmando que o crescimento e desenvolvimento das bromélias pertencentes à sub-família Tillandsioideae é mais lento.

Muraro (2006) observou baixas taxas de germinação para *V. incurvata* em teste com diferentes substratos alocados em vasos distribuídos sob dossel florestal. A média de germinação variou entre os diferentes substratos de 8 a 40%. O autor observou que a germinação ocorreu ao 36º dia de monitoramento e o pico foi visualizado ao 50º dia, valores próximos aos encontrados para as espécies de *Vriesea* do presente trabalho.

O desenvolvimento lento das plântulas também foi verificado por Stringheta et al. (2005) que trabalharam com espécies do gênero *Tillandsia*, em diferentes substratos e verificaram que não houve diferenças visíveis no desenvolvimento e tamanho das plântulas, durante o período e 30 dias.

5.1.2. Germinação *in vitro* de sementes de quatro espécies de *Vriesea*

A germinação *in vitro* iniciou-se ao redor dos 14 dias. O período avaliado foi até 56 dias após a introdução. Após 14 dias observou-se variação entre as espécies e também entre as temperaturas de cultivo, não se observando germinação após o 28º dia após a introdução *in vitro* (Figura 7). Na análise de regressão, o modelo quadrático foi o que melhor se ajustou aos dados de contagem de sobrevivência das plântulas. Houve um decréscimo no número de plântulas ao longo do tempo, observando-se mortalidade de plântulas recém-germinadas em todos os tratamentos. Para *V. carinata*, o maior número de plântulas foi observado aos 21 dias sob 22°C e aos 14 sob 27°C e 32°C. Para as demais espécies registrou-se o maior número de plântulas aos 14 dias em todos os tratamentos.

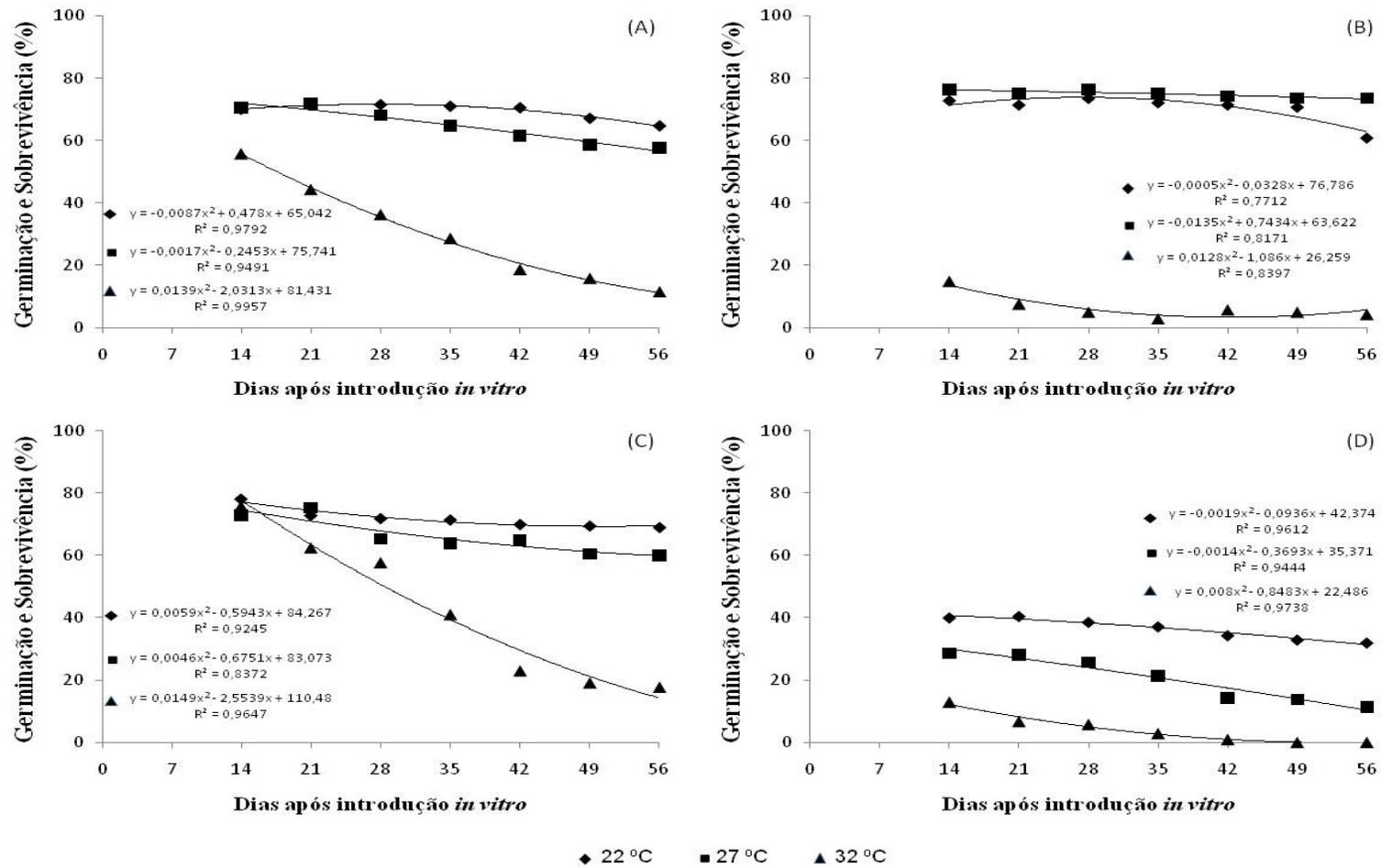


Figura 7 - Porcentagem de germinação de sementes e de sobrevivência de plântulas *in vitro* de *Vriesea carinata* (A), *V. friburgensis* (B), *V. paraibica* (C) e *V. simplex* (D), cultivadas sob diferentes temperaturas (22°C, 27°C e 32°C) sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, dos 14 aos 56 dias após introdução *in vitro*

As maiores taxas de germinação foram registradas para as quatro espécies quando cultivadas a 22 °C, ainda que *V. paraibica*, *V. carinata* e *V. friburgensis* não diferiram entre si e apresentaram valores superiores em relação *V. simplex*. Resultados similares foram observados a 27°C.

O cultivo sob temperatura de 32 °C mostrou-se menos eficiente para três das espécies estudadas, *V. Simplex*, *V. carinata* e *V. friburgensis*, quando comparado aos outros regimes de temperaturas.

Para *V. friburgensis* não foram observadas diferenças significativas entre 22 e 27 °C, sendo encontrados valores acima de 75 % de germinação, com uma queda drástica na taxa de germinação a 32 °C. *V. simplex* apresentou redução mais gradativa na taxa de germinação, com o aumento na temperatura, diminuindo de 60, para 35 e 10% a taxa de germinação a 22, 27 e 32 °C, respectivamente. Já as taxas de mortalidade aumentaram com a elevação da temperatura, para quase todas as espécies estudadas com exceção da *V. friburgensis*, cuja menor mortalidade foi observada a 27°C. A temperatura de 32°C mostrou-se prejudicial a todas as espécies, atingindo 100% de mortalidade para a *V. simplex*.

Tabela 5 - Porcentagem de germinação de sementes e mortalidade de plântulas de *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex*, cultivadas *in vitro* sob diferentes temperaturas durante 56 dias.

Espécies	Germinação (%)			Mortalidade (%)		
	22°C	27°C	32°C	22°C	27°C	32°C
<i>V. carinata</i>	77.14 aA	68.57 aAB	52.57 bB	14.49 aB	24.73 bcB	79.33 bA
<i>V. friburgensis</i>	77.71 aA	76.00 aA	14.85 cB	9.67 aB	4.00 cB	73.33 bA
<i>V. paraibica</i>	80.57 aA	72.00 aA	78.86 aA	14.69 aB	27.03 bB	81.66 abA

<i>V. simplex</i>	59.43 bA	34.86 bB	10.29 cC	24.60 aB	79.72 aA	100.00 aA
CV (%)	13.94			32.46		

Médias acompanhadas de mesma letra não apresentam diferença significativa a 1% pelo Teste de Tukey de comparação de médias. Letras maiúsculas comparam colunas e letras minúsculas comparam linhas.

Considerando-se o comportamento das espécies dentro de cada temperatura, a 22°C todas respondem de forma similar como mostra a Tabela 5. As diferenças mais marcantes entre espécies foram observadas aos 32°C, onde *V. simplex* mostrou-se bastante sensível com apenas 10,29% de plântulas germinadas e com 100% de plantas mortas. Já *V. paraibica*, ainda que tenha apresentado germinação elevada nesta temperatura, apresentou taxa de mortalidade de 81.66%, evidenciando a pouca resistência destas plântulas a temperaturas elevadas.

Segundo classificação definida por Pereira et al. (2008), as sementes de *Vriesea* podem ser consideradas de germinação intermediária (tempo médio de germinação entre 7 e 14 dias), característica da sub-família Tillandsioideae. Resultados similares foram encontrados por de Silva et al. (2009), com germinação de *Vriesea scalaris* cerca de sete dias após a introdução em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP ou KIN.

Taxas de germinação bastante elevadas foram observadas em outras espécies de *Vriesea*, por outros autores. Paggi et al. (2007), em estudos com *Vriesea gigantea*, concluíram que as diferentes populações analisadas tinham sementes altamente viáveis, com uma taxa de germinação *in vitro* de 94% sob temperaturas alternadas de 25°C durante 16 horas de luz e 22°C durante 8 horas de escuro. Em pesquisa realizada por Bencke e Droste (2008) com sementes de *Vriesea gigantea*, a germinação *in vitro* foi de 100% sob a temperatura de 26°C ± 1. Droste et al. (2005) obtiveram taxas de germinação para *V. gigantea* e *V. philippocoburgii* de 99 % e 89 %, sob temperatura de 27 °C, valores altos quando comparados aos encontrados para as quatro espécies de *Vriesea* do presente estudo.

Para outros gêneros de bromélias, também foram observados resultados com elevadas porcentagens de germinação. Silva (2009) obteve 97 % de sementes germinadas de *Tillandsia adpressiflora* sobre duas camadas de papel filtro e irrigadas com água destilada. Duarte et al. (2010), em trabalho com sementes de *Dyckia goehringii* alocadas em câmaras germinadoras em caixas de plástico sobre papel umedecido com água

destilada, verificaram que as sementes germinaram melhor sob a temperatura de 25 °C apesar da ocorrência de germinação sob todas as temperaturas testadas, no intervalo de 25 °C a 35 °C, representando uma adaptabilidade às condições naturais.

Poucos trabalhos citam a utilização de temperaturas inferiores a 25 °C no cultivo *in vitro* de bromélias, como por exemplo, *Dyckia distachya* (POMPELLI; GUERRA, 2004), *Dyckia encholirioides* (POMPELLI et al., 2006) e *Tillandsia eizii* (PICKENS et al., 2003). Nestes trabalhos as culturas foram mantidas em salas climatizadas, com temperaturas variando ao redor de 26 °C. No trabalho desenvolvido por Mollo (2009), as sementes de *Alcantarea imperialis* não germinaram quando mantidas *in vitro* a 5 °C, contudo, ocorreu até 80 % de germinação nos lotes mantidos *in vitro* a 26 °C e a 30 °C. A mesma autora constatou que a porcentagem final de germinação foi a mesma sob diferentes temperaturas utilizadas durante o cultivo *in vitro* (15 °C, 15 °C e 30 °C alternados e 30 °C) quando em comparação com as condições de sala de crescimento (26 °C) *in vitro*.

Com relação às taxas de mortalidade de plântulas germinadas sob 32°C, resultados similares foram encontrados em outros estudos. Em temperaturas altas, as sementes de *Aechmea nudicaulis* e *Streptocalyx floribundus* não apresentaram germinação, mostrando-se sensíveis a altas temperaturas (20°C alternando com 50°C), e perderam a viabilidade após 720 horas de incubação nessa condição (PINHEIRO; BORGHETTI, 2003), o que sugere que em seu habitat elas germinem em microregiões protegidas e não expostas continuamente ao sol.

Essa alta mortalidade de sementes/plântulas cultivadas sob temperaturas mais altas, é discutida com base nos resultados encontrados por Chen et al. (1994) que trabalhando com plantas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro*, sugeriram que sob altas temperaturas há aumento da respiração e redução da absorção de CO₂, resultando na diminuição da produção de carboidratos, inibindo o crescimento e a floração. Somado a isto, o calor excessivo acelera o movimento das moléculas, as ligações químicas que associam os átomos tornam-se mais fracas e as camadas de lipídios das biomembranas tornam-se mais fluidas (LARCHER, 2000).

É preciso levar em conta, ainda, que as bromélias-tanque, como as espécies de *Vriesea*, são beneficiadas pelo ambiente mais sombreado e úmido, pois dependem da água acumulada em suas rosetas para obter umidade e nutrientes provenientes do material orgânico que é decomposto entre as folhas (BENZING, 1976). Assim, elas estão

adaptadas a condições de temperaturas menores. Segundo Pereira et al. (2009), as diferentes exigências de germinação das espécies podem indicar as características do habitat natural que ela ocupa.

De acordo com Borghetti (2005), as espécies tropicais apresentam a temperatura mínima entre 10 e 15 °C e a máxima próxima de 40 °C para germinação, embora algumas espécies apresentem germinação a 45 °C. Sementes de *Neoregelia cruenta*, *Vriesea burle-marxii* Leme, *V. ensiformis* (Vellozo) Beer. e *V. hieroglyphica* (Carrière) E. Morren, bromélias da Mata Atlântica apresentaram temperaturas mínimas de 15 °C, indicando a necessidade de temperaturas mais elevadas para a germinação (MERCIER; GUERREIRO; FILHO, 1990). Pinheiro e Borghetti (2003) encontraram para *A. nudicaulis* e *S. floribundus* temperaturas ótimas mais baixas, em comparação com *D. tuberosa*, no intervalo entre 20 e 30 °C.

Além do efeito da temperatura, autores sugerem que a alta taxa de mortalidade de plântulas ou taxas de germinação baixas *in vitro* em meio MS, pode estar associada à alta concentração de sais presentes na formulação deste meio de cultura (SILVA et al., 2009). No presente trabalho, foi utilizada uma diluição de ¼ dos macronutrientes do meio MS, valor este que pode ainda estar elevado, visto que o MS é um meio com elevada concentração de sais.

Um estudo semelhante ao realizado no presente trabalho foi realizado por Vaz et al. (2004), no qual avaliaram os efeitos da temperatura no crescimento de plantas *Psychomorphis pusilla* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro*. Esses autores mostraram que a qualidade das plantas era obtida quando a temperatura de cultivo era mantida a 27°C, que é próxima à temperatura da região tropical do Brasil onde esta espécie ocorre naturalmente. Também é interessante destacar que temperaturas constantes de 22 °C e 32 °C (temperaturas mínima e máxima do local de origem desta espécie) foram negativas para o crescimento *in vitro* dessas plantas. Para as espécies de bromélias estudadas neste projeto, apenas a temperatura de 32°C mostrou-se negativa, sendo que houve uma variação entre as espécies quanto à temperatura sob a qual obtiveram melhor desempenho, com relação às taxas de germinação e mortalidade, como já citado. Além da resposta diferenciada das espécies às temperaturas, não houve homogeneidade e sincronidade na germinação. Resultados similares foram encontrados para sementes de *Dyckia tuberosa*, sendo que próximo ao intervalo da temperatura ótima há uma maior sincronização (VIEIRA et al., 2007).

Com base nestes resultados, pode-se inferir então, que o sucesso reprodutivo das espécies estudadas é susceptível a variações de temperatura. Além disso, pôde-se notar que as formas de vida epífitas, como é o caso das espécies de *Vriesea* estudadas, são sensíveis a distúrbios e perturbações do habitat natural no qual se encontram ou a alterações no microclima (HIETZ; HIETZ-SEIFERT, 1995, BENZING, 1998; PADMAWATHE et al., 2004, WOLF, 2005). Estes fatos, somados a sua mortalidade tipicamente alta, permite se inferir que as plântulas epífitas serão as primeiras afetadas pelas mudanças climáticas globais, nos estágios iniciais de desenvolvimento (BENZING, 1998; FOSTER, 2001). Espera-se que as epífitas sobrevivam apenas em posições relativamente protegidas dentro dos habitats que hoje ocupam e serão, certamente, as primeiras indicadoras das alterações no meio ambiente (WINKLER et al., 2005), como mudanças climáticas globais (LUGO; SCATENA, 1992).

Como uma visão geral do estudo de germinação e com base na comparação dos estudos de germinação *in vitro* e *ex vitro*, pode-se afirmar que a germinação *ex vitro* é mais lenta que *in vitro*. Esse fato pode estar relacionado, dentre outros fatores, à disponibilidade de água e nutrientes *in vitro*, à presença de regulador de crescimento vegetal e ao processo de assepsia ao qual são submetidas às sementes introduzidas *in vitro*, uma vez que o hipoclorito de sódio, amplamente utilizado em laboratórios para realização da assepsia dos explantes (MEIRELES et al., 2007), pode atuar como promotor da germinação agindo até mesmo em casos de quebra de dormência. A sua atuação é na escarificação do tegumento das sementes aumentando sua permeabilidade à água, oxigênio e solutos, e na remoção ou oxidação de compostos inibitórios da germinação. Esse fato pode contribuir para um menor tempo na germinação das sementes *in vitro* quando em comparação com as sementes germinadas *ex vitro* (MEIRELES et al., 2007).

Além disso, nos estágios iniciais de vida, espécies de Tillandsioideae são equipadas por camadas mais densas de tricomas escamiformes do que em estágios de plantas adultas (MADISON, 1977; ADAMS; CRAIG, 1986). Esses tricomas reduzem a perda de água e aumentam a sua absorção, mas por outro lado, limitam a fotossíntese (ADAMS; CRAIG, 1986) quando a superfície da folha está úmida e os estômatos ficam recobertos parcialmente pelas escamas impedindo as trocas gasosas (BENZING, 1978). Como nas condições *in vitro*, a planta não depende da fotossíntese para se desenvolver já que elas têm crescimento heterotrófico (INOUE et al., 1998), esses tricomas não

prejudicam seu desenvolvimento, pelo contrário, auxiliam na absorção de água. Já as plantas cultivadas *ex vitro*, tem sua fotossíntese reduzida, quando em dias úmidos, ficando retardadas no desenvolvimento.

Ademais, as taxas de germinação foram maiores *in vitro*. Uma vez que a proporção de estabelecimento das sementes germinadas é diretamente influenciada pela disponibilidade e contato com a água, esse fato poderia explicar as maiores proporções de germinação em condições *in vitro* em placas de Petri (ACEVES; WOLF, 2008). Entretanto, isto não foi observado quando comparamos as taxas de germinação *ex vitro* com as taxas *in vitro*, sob a temperatura de 32 °C, confirmando que esta temperatura foi realmente prejudicial ao processo germinativo das espécies estudadas.

Assim, as condições de germinação *in vitro* aqui utilizadas são efetivas para obtenção de melhores resultados e de um maior número de plantas e superam as deficiências e problemas expostos pela germinação *ex vitro*. Somado a isso, a germinação *in vitro* contribui para um melhor entendimento do comportamento das espécies, pois permite a detecção das diferenças entre elas e garantem a inferência de seu comportamento no habitat natural.

Os resultados obtidos neste trabalho com a germinação *in vitro* podem subsidiar a conservação em laboratório das espécies estudadas e o estabelecimento de um banco de germoplasma *in vitro*. A conservação de germoplasma de bromeliáceas deve ser feita a partir de sementes oriundas de populações amostradas e por isso é determinante um protocolo para a germinação *in vitro* e obtenção de plântulas que serão os explantes de partida pra a conservação.

5.2. Análise morfoanatômica do desenvolvimento de plântulas de espécies de *Vriesea*

As sementes de *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex* são pequenas, filiformes, com tegumento castanho amazonzado e longo apêndice plumoso esbranquiçado em apenas uma das extremidades da semente (Figuras 8A e 9A, 10A, 11A e 12A).

A germinação das sementes iniciou-se entre o terceiro e o quarto dia após a introdução das sementes *in vitro*, observando-se sequência similar de etapas nas quatro espécies estudadas. Inicialmente observa-se, a partir da extremidade onde se forma o

apêndice plumoso, a extrusão da raiz primária rudimentar e da bainha cotiledonar (Figuras 8B e 9B, 10B, 11B e 12B). Na bainha cotiledonar o lóbulo foliar foi observado em *V. carinata*, *V. friburgensis* e *V. simplex*, não sendo característico em *V. paraibica*. Na sequência observa-se a extrusão do primeiro eófilo (Figuras 8C e 9C, 10C, 11C e 12C), ao redor de 15 dias e do segundo eófilo, ao redor de 20 dias (Figuras 8D e 9D, 10D, 11D e 12D).

A epiderme dos eófilos apresenta grande quantidade de tricomas escamiformes desde o início do desenvolvimento. O segundo eófilo possui características morfológicas similares ao primeiro e, com a sua formação, observa-se o início de um pequeno tanque com a sobreposição do primeiro eófilo pelo segundo. Ao redor dos 40 dias já observa-se a planta jovem formada (Figuras 8E, 9E, 10E, 11E e 12E).

Nas secções longitudinais de sementes em processo inicial de germinação (Figuras 9F, 10F, 11F e 12F) de todas as espécies estudadas, é possível a observação do cotilédone haustorial no interior do tegumento da semente, em contato com o endosperma (Figura 10F) e de formato cilíndrico. Além disso, pode-se visualizar o procâmbio, a protoderme, restos do tegumento da semente, o ápice meristemático caulinar e o(s) eófilo(s) em formação a partir do meristema apical caulinar. Nas quatro espécies observou-se a raiz primária vestigial, de tamanho bastante reduzido, com ou sem a presença de coifa, esta observada principalmente em secção longitudinal de *V. friburgensis* (Figura 10F). Não é possível a distinção de meristema apical radicular nas secções histológicas observadas; possivelmente nas fases de desenvolvimento observadas a raiz primária já cessou seu desenvolvimento. O hipocótilo, também bastante reduzido em tamanho pode ser observado entre a bainha cotiledonar e a raiz primária, em todas as espécies.

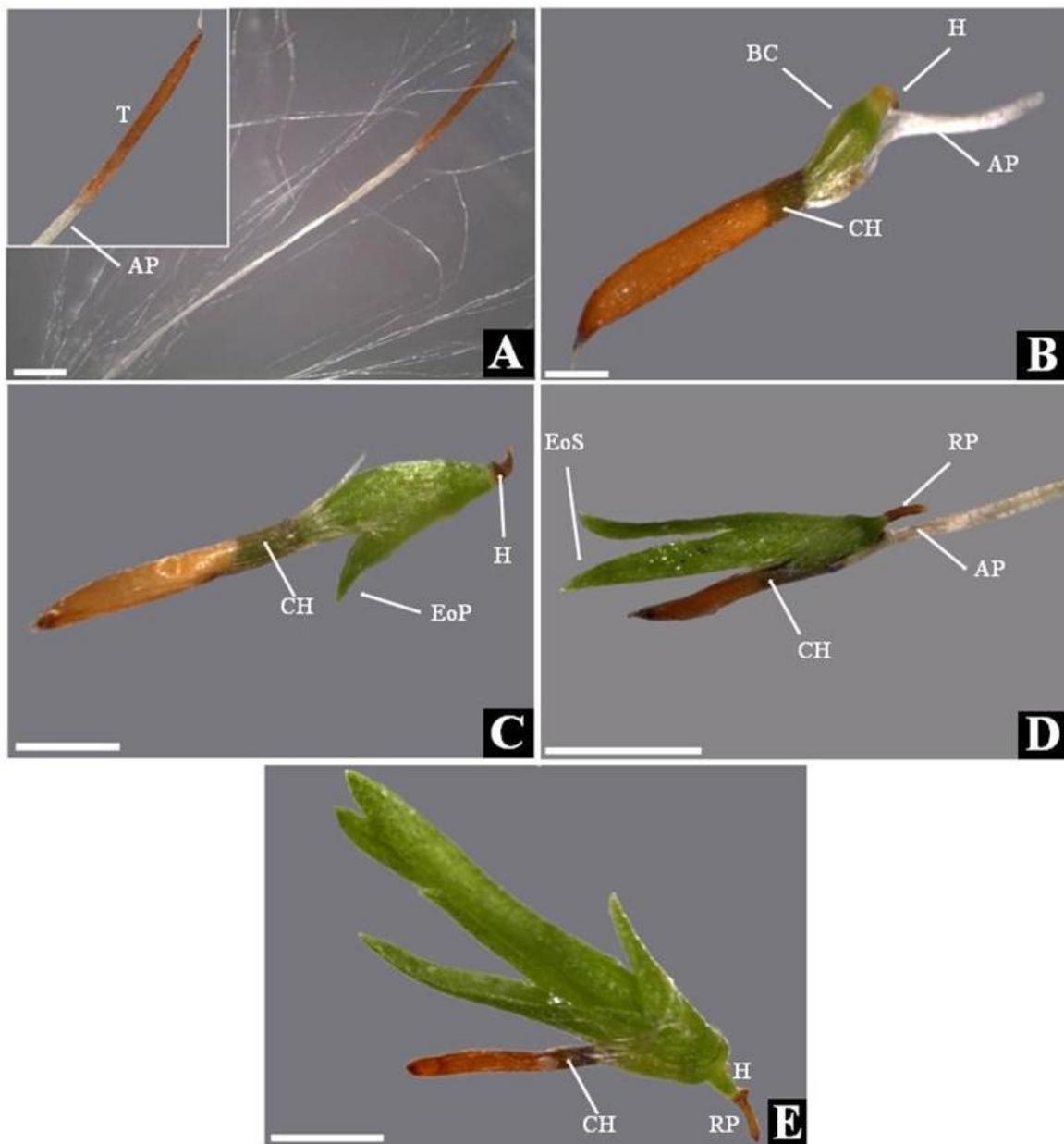


Figura 8 - Semente, germinação e plântula de *Vriesea* sp *in vitro* ilustrando as seguintes etapas: semente (A), na qual observa-se o apêndice plumoso (AP) e o tegumento (T) que envolve o embrião; início da extrusão da raiz primária e bainha cotiledonar (B); emissão do primeiro eófilo (C); emissão do segundo eófilo (D); planta jovem (E). Em C e D o apêndice plumoso teve seu tamanho reduzido a fim de se evitar contaminações quando *in vitro*. BC = bainha cotiledonar, CH = cotilédono haustorial observado por transparência no interior do tegumento; EoP = primeiro eófilo; EoS = segundo eófilo; H = hipocótilo; RP = raiz primária. Barras: 1 mm

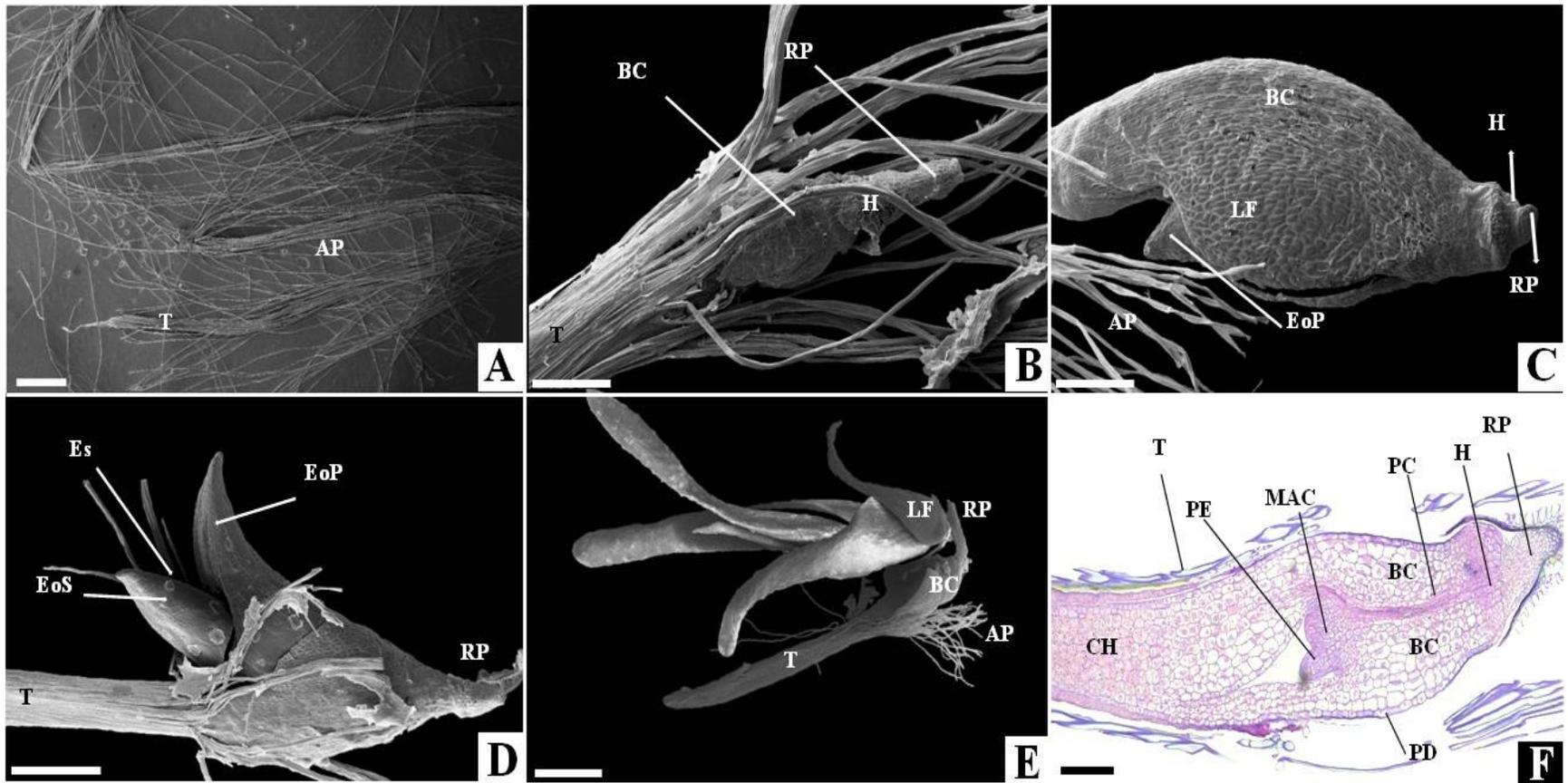


Figura 9 - *Vriesea carinata*. Vista frontal da morfologia da semente, germinação e planta jovem: semente (A); início da extrusão da raiz primária e bainha cotiledonar (B); emissão do primeiro eófilo (C); emissão do segundo eófilo (D); planta jovem (E). Secção longitudinal da semente contendo o embrião cinco dias após o início da germinação (F). AP = apêndice plumoso; BC = bainha cotiledonar; CH = cotilédone haustorial; EoP = primeiro eófilo; EoS = segundo eófilo; Es = escama; H= hipocótilo; LF = lóbulo foliar; MAC = meristema apical caulinar; PC = procâmbio; PD = protoderme; PE = primórdio de eófilo; T = tegumento. Barras: A-E = 1 mm; F = 100 μ m.

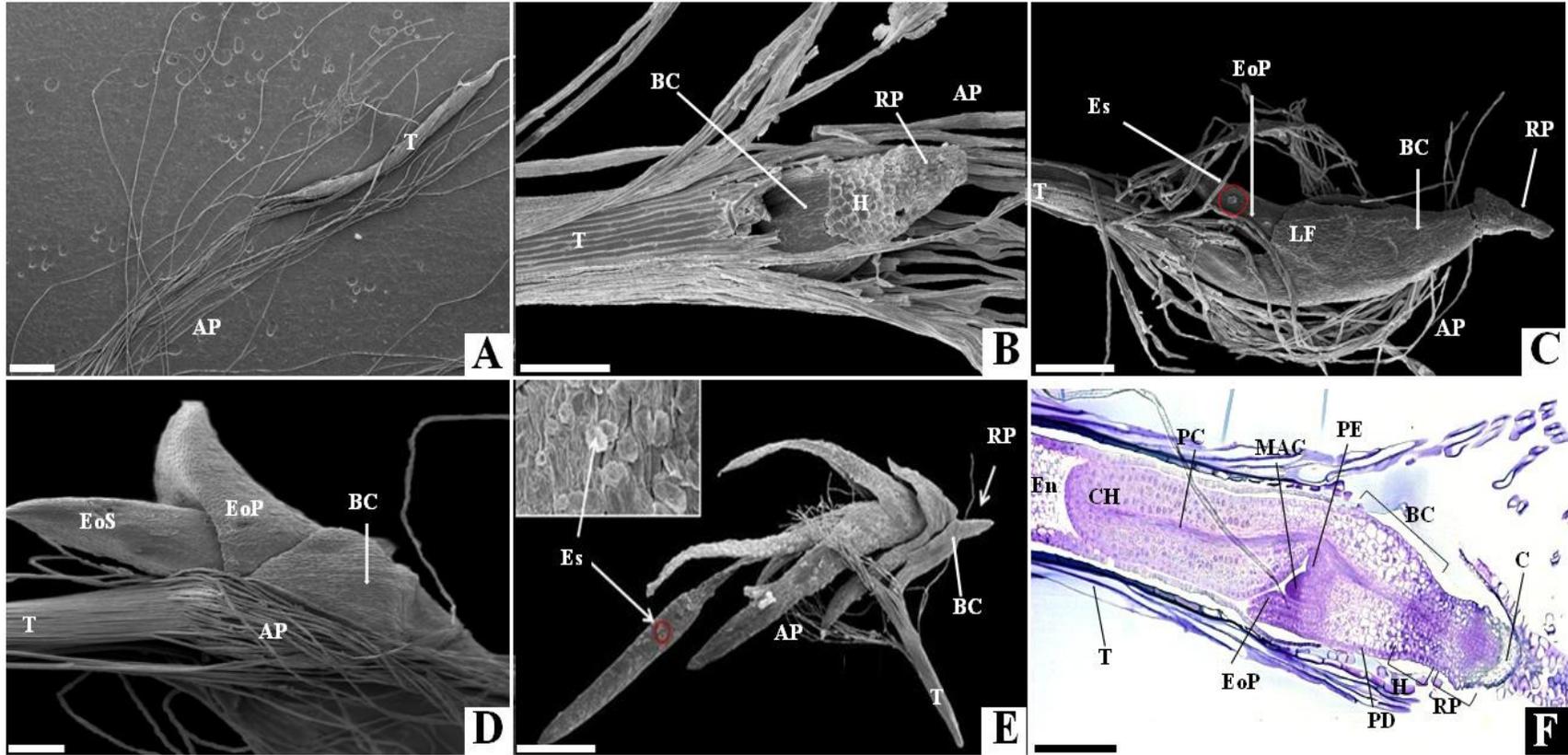


Figura 10 - *Vriesea friburgensis*. Vista frontal da morfologia da semente, germinação e planta jovem: semente (A); início da extrusão da raiz primária e bainha cotiledonar(B); emissão do primeiro eófilo (C); emissão do segundo eófilo (D); planta jovem (E). Secção longitudinal da semente contendo o embrião seis dias após início da germinação (F). AP = apêndice plumoso; BC = bainha cotiledonar; C = coifa; CH = cotilédono haustorial; EoP = primeiro eófilo; EoS = segundo eófilo; Es = escama; H = hipocótilo; LF = lóbulo foliar; MAC = meristema apical caulinar; PC = procâmbio; PD = protoderme; PE = primórdio de eófilo; RP = raiz primária; T = tegumento. Barras: A-E = 1 mm; F = 200 μ m.

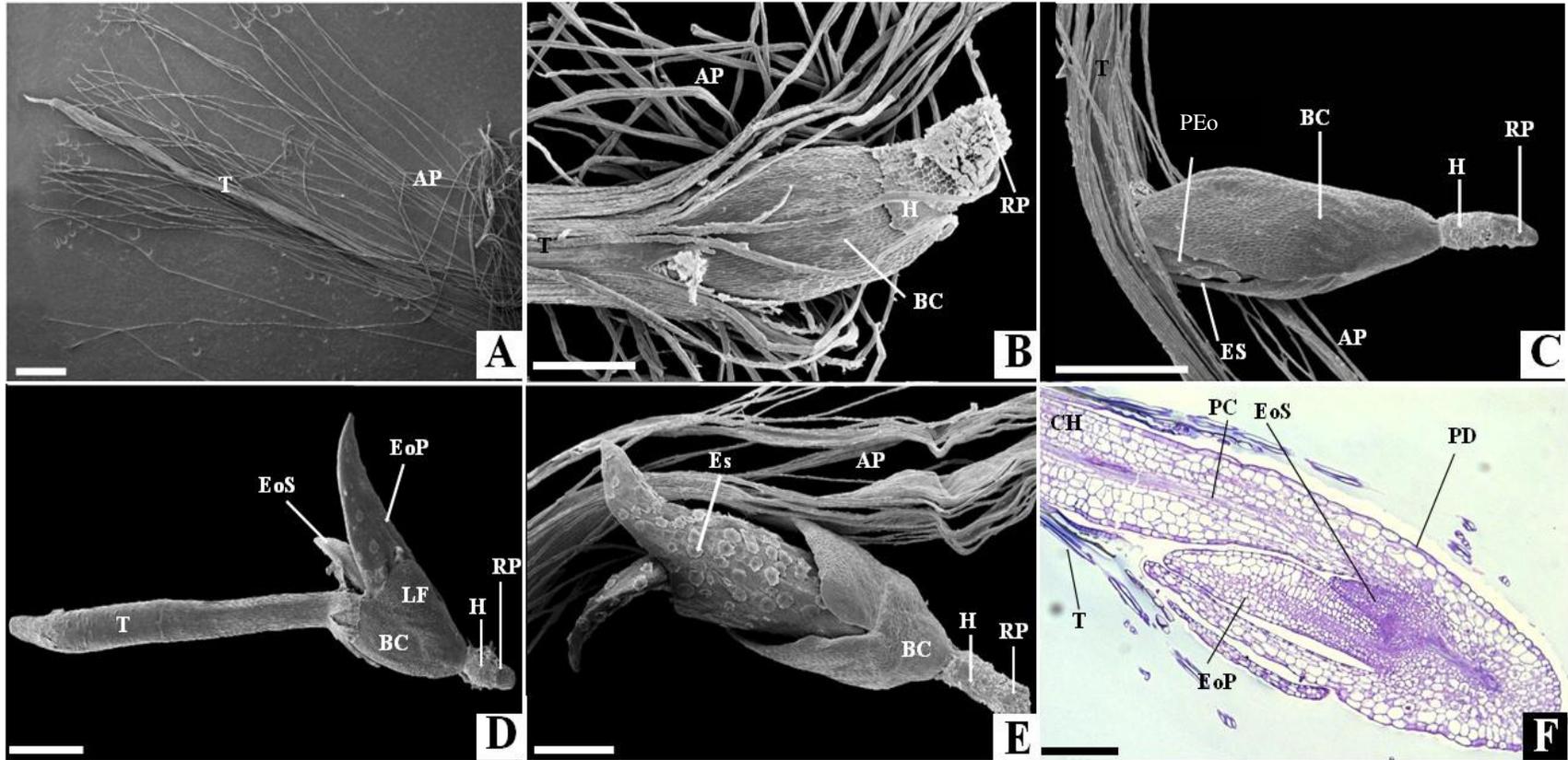


Figura 11 - *Vriesea paraibica*. Vista frontal da morfologia da semente, germinação e planta jovem: semente (A); início da extrusão da raiz primária e bainha cotiledonar (B); emissão do primeiro eófilo (C); emissão do segundo eófilo (D); planta jovem (E). Secção longitudinal tangencial da semente contendo o embrião doze dias após início da germinação (F). Em D o apêndice plumoso teve seu tamanho reduzido a fim de se evitar contaminações quando *in vitro*. AP = apêndice plumoso; BC = bainha cotiledonar; CH = cotilédone haustorial; EoP = primeiro eófilo; EoS = segundo eófilo; Es = escama; H = hipocótilo; LF = lóbulo foliar; PC = procâmbio; PD = protoderme; RP = raiz primária; T = tegumento. Barras: A-E = 1 mm; F = 200 μ m.

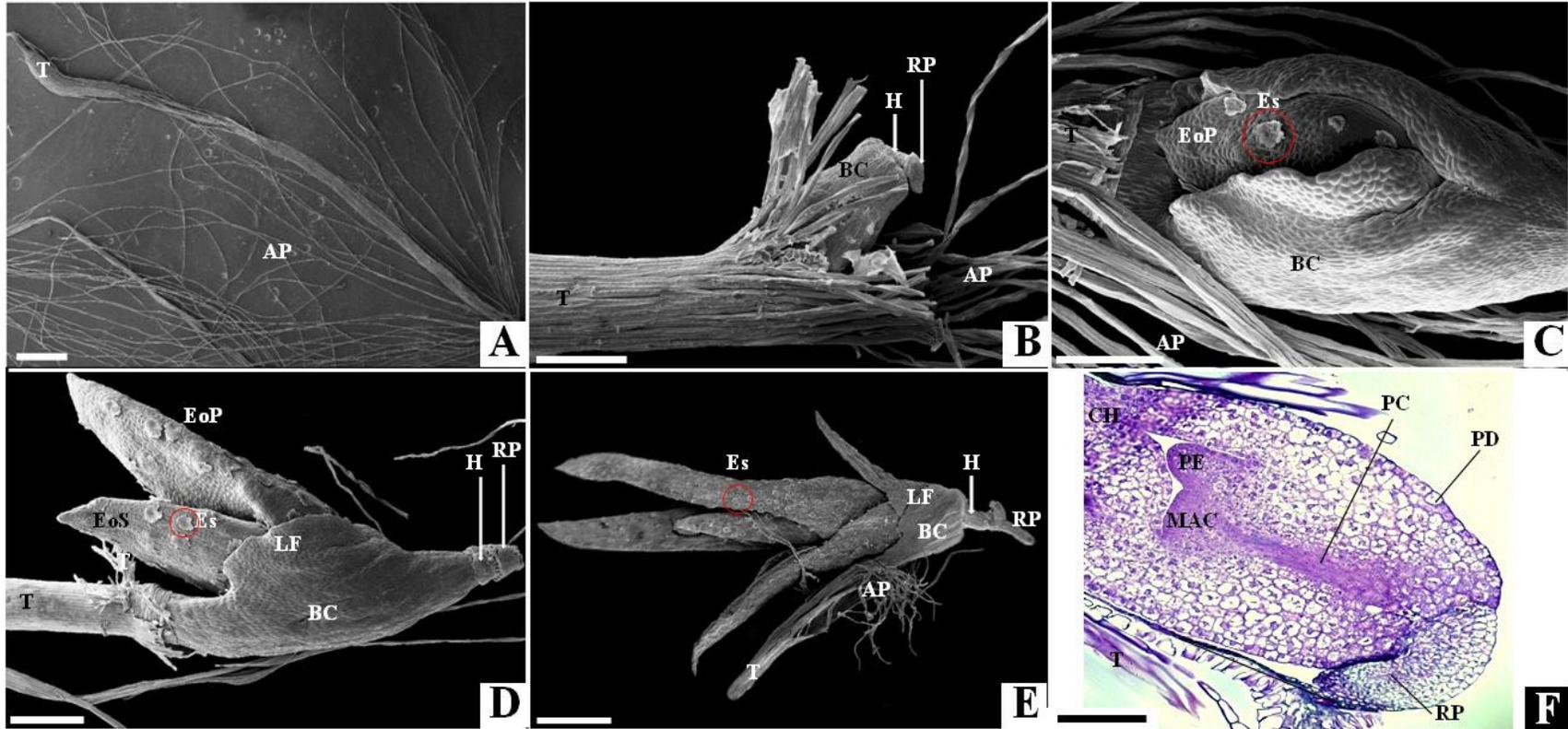


Figura 12 - *Vriesea simplex*. Vista frontal da morfologia da semente, germinação e planta jovem: semente (A); início da extrusão da raiz primária e bainha cotiledonar (B); emissão do primeiro eófilo (C); emissão do segundo eófilo (D); planta jovem (E). Secção longitudinal da semente contendo o embrião com oito dias de germinação (F). Em D o apêndice plumoso teve seu tamanho reduzido a fim de se evitar contaminações quando *in vitro*. AP = apêndice plumoso; BC = bainha cotiledonar; CH = cotilédone haustorial; EoP = primeiro eófilo; EoS = segundo eófilo; Es = escama; H= hipocótilo; LF = lóbulo foliar; MAC = meristema apical caulinar; PC = procâmbio; PD = protoderme; PE = primórdio de eófilo; RP = raiz primária; T = tegumento. Barras: A-E = 1 mm; F = 100 μ m.

Sementes pequenas são vantajosas para epífitas uma vez que um habitat pode ser recoberto por um maior número de sementes, aumentando a chance de que um número adequado de sementes se disperse em local com condições apropriadas para a germinação. Além disso, sua grande proporção superfície-volume favorece a rápida absorção de água (MADISON, 1977). Por outro lado, sementes pequenas possuem reservas limitadas (BENZING, 1990), acarretando, muitas vezes, em altos índices de mortalidade (HOWE; SMALLWOOD, 1982; JAKOBSSON; ERIKSSON, 2000). Assim, a germinação e o estabelecimento das plântulas são os estágios mais vulneráveis no ciclo de vida das plantas (HARPER, 1977). Apesar deste fato, o processo de germinação está entre os aspectos menos estudados da reprodução de bromélias (SCATENA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008; SILVA, 2009).

As características das sementes também foram observadas por Mantovani e Iglesias (2005); Pereira *et al.* (2008) e Silva e Scatena (2011). Silva et al. (2009) verificou a existência de revestimento de mucilagem em sementes de *Aechmea* (Bromelioideae), presença de ala membranácea em sementes de *Dyckia* (Pitcairnioideae) e de apêndices plumosos na porção micropilar em *Tillandsia* (Tillandsioideae). Assim, esse aspecto se apresenta como um importante caractere em nível infra-familiar. Nossos resultados corroboram com este fato, reiterando a sua importância para a taxonomia da família. Segundo Benzing (2000) e Silva e Scatena (2001), os apêndices desta sub-família constituem uma plumagem que contribui efetivamente para a dispersão anemocórica disseminando as sementes que podem germinar na maioria dos lugares onde caem, e assim, contribuindo para o sucesso da dispersão.

As diferentes etapas do desenvolvimento pós-seminal também foram verificadas e descritas por outros autores, como Pereira et al. (2008), Tillich (2007), Scatena et al. (2006), Silva (2009), Silva e Scatena (2011) em espécies de Tillandsioideae. Silva e Scatena (2011) observaram que a germinação de *Tillandsia adpressiflora* iniciou com a emissão do cotilédone haustorial na extremidade na qual se localizam os apêndices, oito dias após a embebição e sem a formação de raiz primária. Dezesesseis dias após a embebição ocorre a emergência do primeiro eófilo e após 23 dias observa-se a formação de pequeno tanque pela emergência do segundo eófilo. A partir de 40 dias após a embebição observa-se a planta jovem formada com início de formação de raízes adventícias. Nesta espécie, o tempo para germinação foi mais longo do que observamos

para as espécies de *Vriesea* do presente estudo. No entanto as condições de germinação foram também diferentes, como uso de GA₃ e germinação em meio de cultura, diferentemente de Silva e Scatena (2011), que realizaram germinação em papel de filtro. A germinação mais rápida pode também ser uma característica de espécies do gênero *Vriesea*, já que Pereira et al. (2008), trabalhando com *Vriesea heterostachys* nas mesmas condições de Silva (2009) observou que a germinação ocorreu ao redor do 4º dia.

A presença de tricomas para absorção logo no início do desenvolvimento da plântula e o tamanho reduzido da raiz primária estão de acordo com a característica epífita das bromélias deste gênero (MANTOVANI; IGLESIAS, 2005). Silva (2009) também verificou a presença das escamas em todas as fases do desenvolvimento pós-seminal em representantes das três subfamílias. Scatena et al. (2006) observaram a formação de pequeno tanque com a emissão do segundo eófilo, como foi verificado para as espécies de *Vriesea* no presente estudo. O tanque permanece em uma posição vertical devido à presença do haustório e é capaz de armazenar água e serrapilheira para sua nutrição, em seu habitat nativo (SCATENA et al., 2006).

As etapas do desenvolvimento pós-seminal aqui observados corroboram em parte com os resultados apresentados por Pereira et al. (2008). Estes autores observaram que para as espécies de Bromelioideae e Pitcairnioideae, a germinação iniciou-se com o rompimento do tegumento e prostrusão da raiz primária, enquanto que para as espécies de Tillandsioideae, a germinação iniciou-se com a emergência da bainha do cotilédone, com a raiz primária em início de desenvolvimento, posteriormente observando-se o desenvolvimento da raiz primária, com a presença da coifa. Para as espécies de *Vriesea* de nosso estudo foi observada a formação de raiz primária rudimentar apenas, observando-se o hipocótilo inconspícuo, como região intermediária entre a raiz primária e a bainha cotiledonar, como descrito por Tillich (2007) e observado também por Pereira et al. (2008). Em *V. friburgensis*, uma estrutura recobrando a raiz primária rudimentar foi também observada, possivelmente a coifa, também descrita por Pereira et al. (2008) em *V. heterostachis*. Nas espécies de *Vriesea* estudadas no presente trabalho, não observou-se o desenvolvimento de raízes secundárias, como observado por Pereira et al (2008).

Em espécie do gênero *Tillandsia*, Scatena et al. (2006), Silva (2009) e Scatena e Silva (2011) verificaram que o primeiro órgão que emerge do envoltório seminal foi o haustório, juntamente com a bainha cotiledonar, sem o desenvolvimento de raiz primária.

A ausência de raiz primária e uma completa diferenciação do cotilédone em haustório são consideradas características derivadas em Bromeliaceae e em outras plântulas de monocotiledôneas, com importância taxonômica (TILLICH, 2000). Além disso, devido ao hábito epífita das espécies de bromélias da sub-família Tillandsioideae, as plantas apresentam raízes rudimentares ou ausentes cuja função é a fixação das plantas nas árvores, sendo os tricomas foliares muito eficientes na absorção de água e nutrientes (BENZING, 2000). Em contrapartida, espécies rupícolas e terrestres desenvolvem considerável volume de raízes funcionais (PAULA; SILVA 2004).

Uma vez que o cotilédone não se desprende do tegumento da semente, mantendo o haustório no interior da semente, a plântula é denominada criptocotiledonar. Parte do cotilédone é foliáceo e emerge da semente na forma de bainha cotiledonar (TILLICH, 2007). Internamente à semente observa-se o endosperma, tecido de reserva, sendo que a absorção e transferência de compostos de reserva para a plântula em germinação são feitas pelo cotilédone haustorial, órgão que ocorre em poucas espécies de dicotiledôneas, mas onipresente em monocotiledôneas (GARWOOD, 1996). Essa característica foi também observada em membros das outras subfamílias de Bromeliaceae. Silva (2009) observou que todas as espécies por ela estudadas, apresentaram plântulas criptocotiledonares: *Aechmea bromeliifolia*, *A. castelnavii* (Bromelioideae); *Dyckia duckei*, *D. racemosa* (Pitcairnioideae) e *Tillandsia adpressiflora* (Tillandsioideae), evidenciando que esse caractere não deve ser considerado na distinção de subfamílias. Segundo classificação de Garwood (1996), o tipo de planta analisada no presente estudo é criptocotiledonar/epígea com cotilédone de reserva.

Em relação à descrição do desenvolvimento pós-seminal desta espécie e sua comparação com a das subfamílias Pitcairnioideae, Bromelioideae, Pereira et al. (2008) observou que há diferenças morfológicas marcantes e peculiares aos gêneros. A descrição do padrão de desenvolvimento pós-seminal obtido pelo autor para a subfamília Bromelioideae envolve a presença de bainha cotiledonar curta, hipocótilo bem reduzido ou inexistente na plântula e a raiz primária cresce moderadamente em comprimento. Já em Pitcairnioideae a bainha cotiledonar é grande, o hipocótilo é evidentemente alongado e a raiz primária é medianamente desenvolvida. Finalmente, para Tillandsioideae, como corroborado neste trabalho, a bainha cotiledonar apresenta-se com tamanho mediano, e há forte tendência da raiz primária ser ausente.

5.3. Ajuste mineral do meio de cultura

Após cultivo das plantas nos diferentes meios de cultura testados, observou-se que todos os tratamentos exibiram crescimento e coloração das folhas semelhantes, aparentemente não sendo visíveis características de deficiências ou excesso de nutrientes. A massa de matéria fresca e a massa de matéria seca para todas as espécies estudadas quando cultivadas nos nove meios de cultura e nos controles formulados são bem semelhantes dentro de cada espécie.

Observa-se nas Figuras 13 e 14, que as massas de matéria fresca e seca seguem o mesmo padrão, nos diferentes tratamentos e espécies, sendo que *V. paraibica* acumulou mais massa de matéria fresca e seca em relação às demais espécies em todos os tratamentos com exceção do tratamento 2 para massa de matéria fresca.

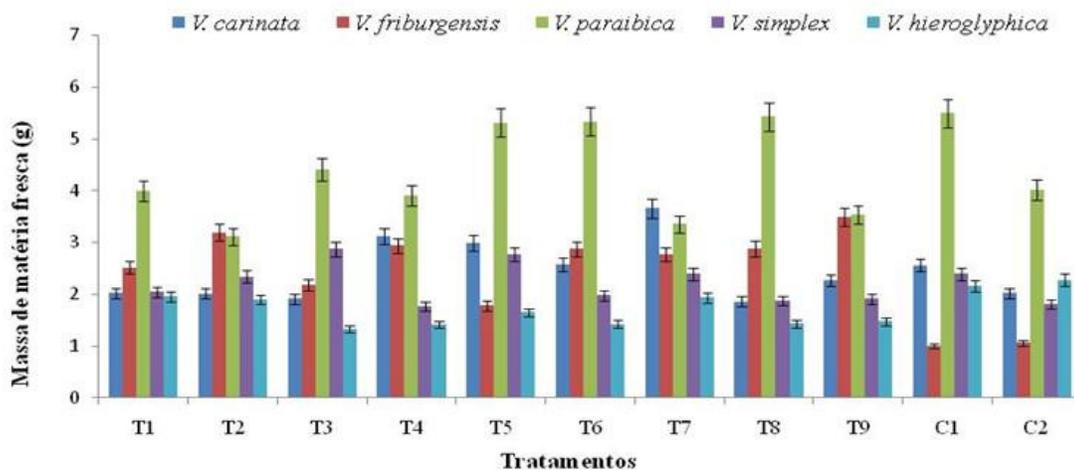


Figura 13 - Média de três repetições de massa de matéria fresca de plantas provenientes dos diferentes tratamentos para cada espécie. C= controle; T= tratamento. C1 corresponde ao meio M4 (ARANDA-PERES et al., 2009)

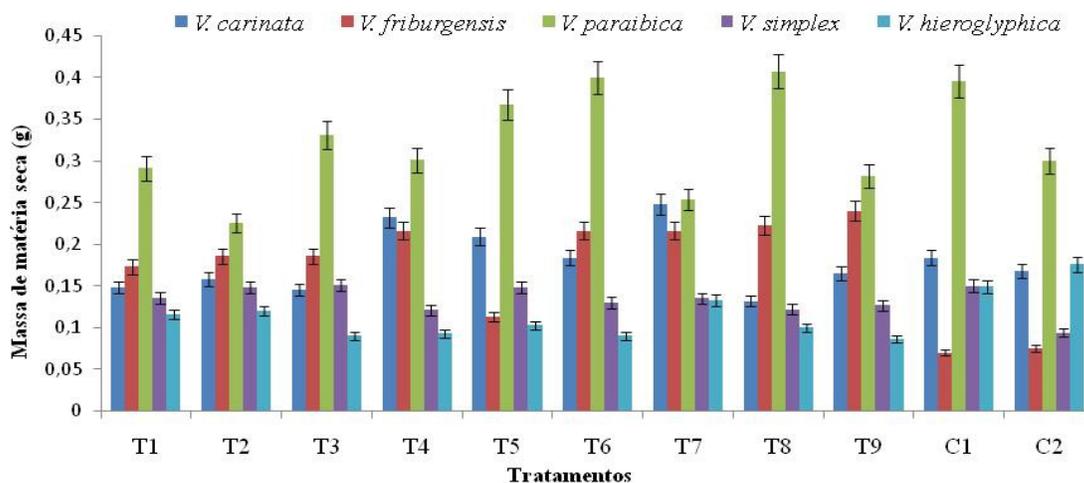


Figura 14 - Média de três repetições de massa de matéria seca de plantas provenientes dos diferentes tratamentos para cada espécie. C= controle; T= tratamento. C1 corresponde ao meio M4 (ARANDA-PERES et al., 2009)

A análise de variância da produção de massa fresca revelou significância ($P < 0,15$) para interação entre as doses de N e Mg fornecidas no meio de cultura para todas as espécies com exceção de *V. paraibica*, ajustando-se a modelo polinomial para as demais espécies. Para *V. paraibica*, as doses de cada nutriente avaliadas separadamente também não acarretaram em diferenças significativas no acúmulo de matéria fresca. Assim, os tratamentos não promoveram efeitos significativos nesta espécie, sob as condições do presente experimento, o que pode refletir a baixa exigência nutricional destas plântulas em N e Mg.

Para *V. carinata*, ocorreu interação significativa entre as doses de N e Mg para a produção de massa de matéria fresca, sendo que, o ponto de máxima produção de matéria fresca foi obtido com as doses de N de 336 mg L^{-1} e de Mg de 18 mg L^{-1} (tratamento 7) e o ponto de mínima produção de matéria fresca foi obtido com as doses de N de 112 mg L^{-1} e de Mg de 54 mg L^{-1} (tratamento 3) (Figura 15).

$$Y = 0,717 + 0,022N - 0,033Mg - 0,00003N^2 - 0,0002NMg + 0,0007Mg^2 \quad (R^2 = 0,31^*)$$

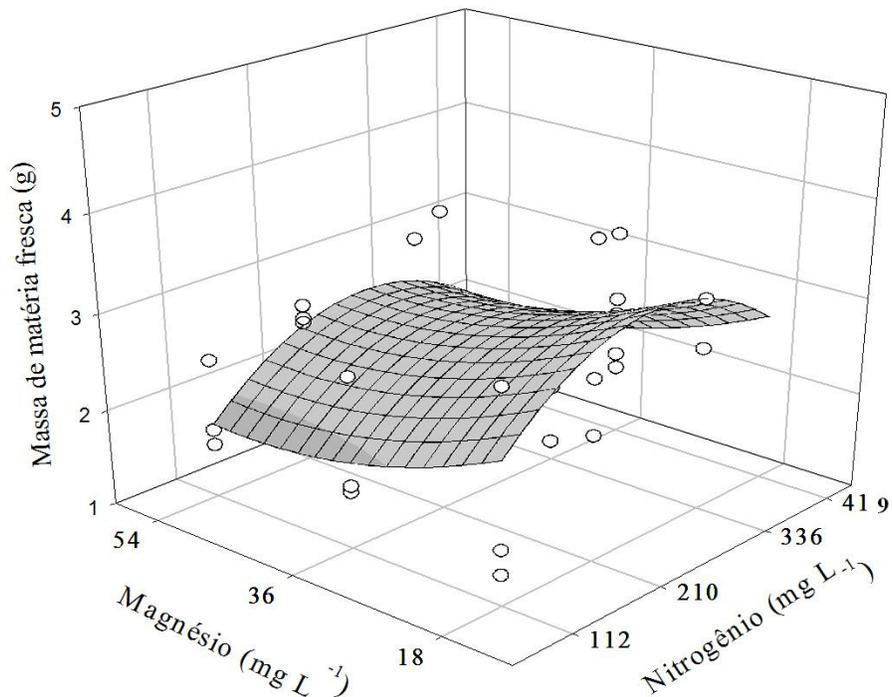


Figura 15 - Produção de massa de matéria fresca de *Vriesea carinata* em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura

Para *V. friburgensis*, também houve interação significativa entre as doses de N e Mg para a produção de massa de matéria fresca (Figura 16), sendo que, a máxima produção foi obtida com o suprimento das doses de N de 210 mg L⁻¹ e de Mg de 54 mg L⁻¹ (tratamento 6). Assim, pode-se observar que para esta espécie doses mais elevadas de magnésio, combinadas com doses intermediárias de nitrogênio para o intervalo de doses avaliado proporcionaram as melhores respostas. A menor produção de matéria fresca ocorreu na combinação da dose mais alta de N (419 mg L⁻¹) com a dose mais baixa de Mg (18 mg L⁻¹). A concentração de N e Mg utilizada nos controles exerceu um efeito inibitório no crescimento.

$$Y = 3,262 + 0,013N - 0,116Mg - 0,00004N^2 + 0,0001NMg + 0,001Mg^2 \quad (R^2 = 0,35^*)$$

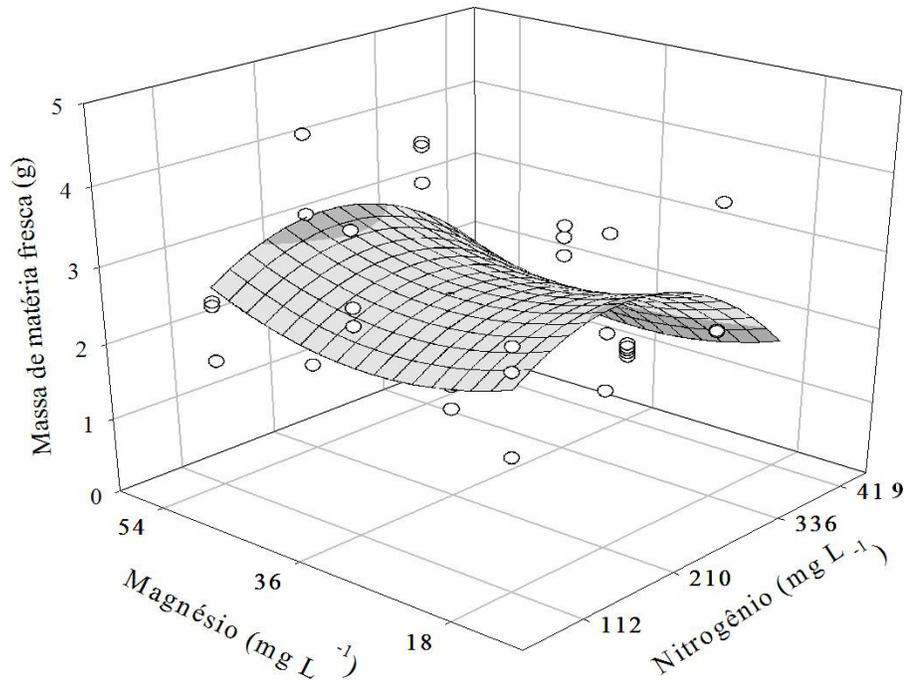


Figura 16 - Produção de massa de matéria fresca de *Vriesea friburgensis* em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura

O comportamento da *V. Simplex* foi similar ao registrado para *V. friburgensis*, reforçando o efeito inibidor diante da mais alta concentração de N e da mais baixa de MG, indicando uma possível inibição competitiva entre os íons NH_4^+ e Mg^{2+} , devido ao excesso de N fornecido no meio de cultura. Por outro lado, pode-se observar maior produção de massa fresca na combinação da dose de N de 112 mg L^{-1} com a mais alta dose de Mg (54 mg L^{-1}) (tratamento 3).

$$Y = 0,776 + 0,002N + 0,076Mg + 0,000005N^2 - 0,0002NMg - 0,0005Mg^2 \quad (R^2 = 0,18^*)$$

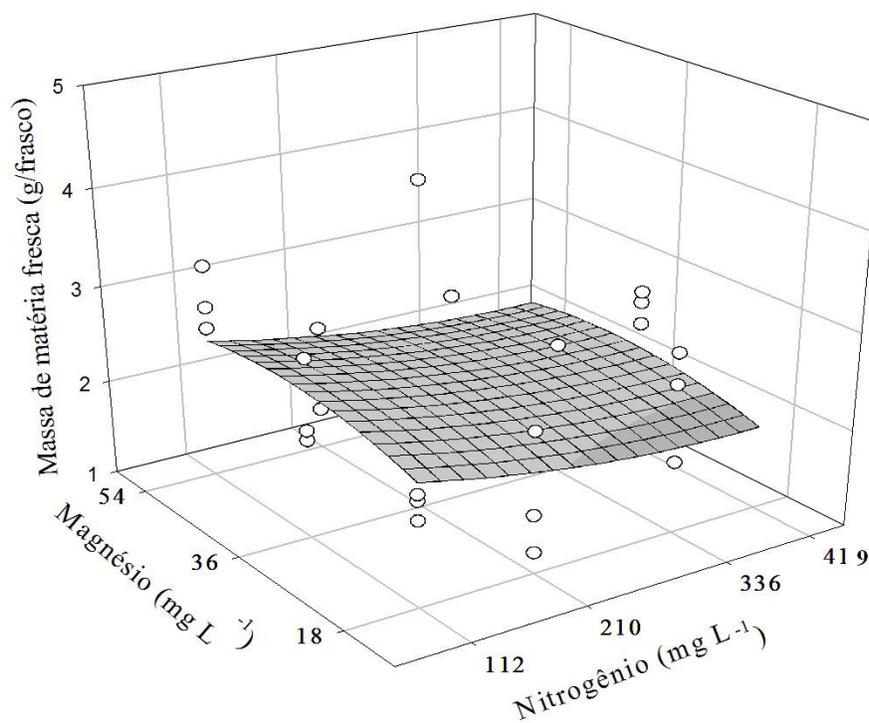


Figura 17 - Produção de massa de matéria fresca de *Vriesea simplex* em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura

Com relação à *V. hieroglyphica*, a dose de N de 336 mg L⁻¹ combinada com a de Mg de 54 mg L⁻¹ (tratamento 9) promoveu maior produção de matéria fresca (Figura 18). Já a menor produção de matéria fresca ocorre com a combinação menor dose de N (112 mg L⁻¹) combinada com a dose intermediária de Mg (36 mg L⁻¹) (tratamento 2).

$$Y = 3,973 + 0,0009N - 0,093Mg - 0,00001N^2 + 0,0001NMg + 0,0009Mg^2 \quad (R^2 = 0,11)$$

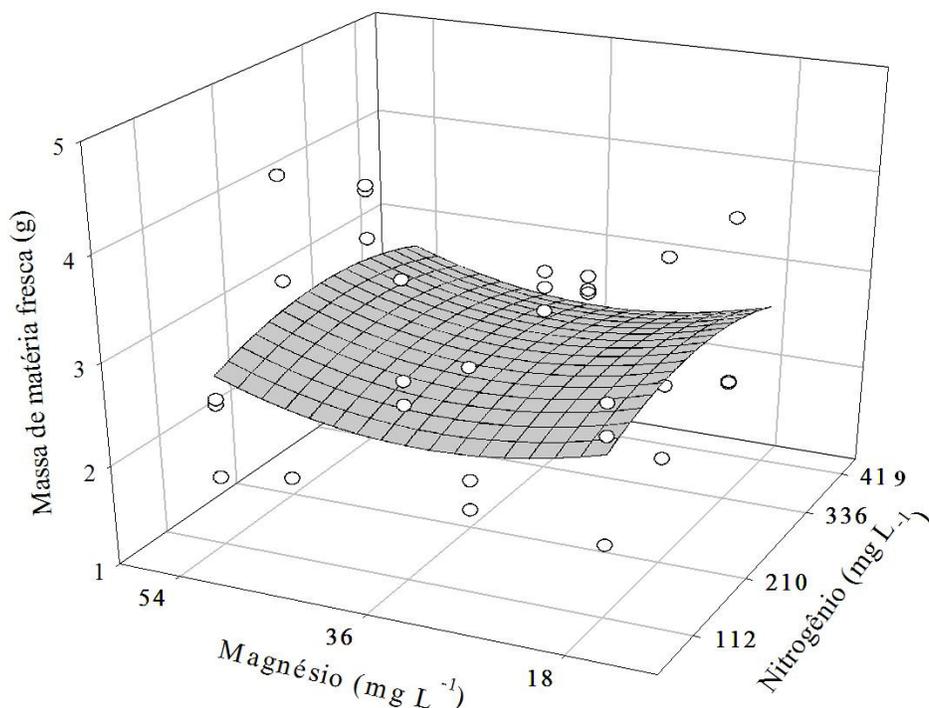


Figura 18 - Produção de massa de matéria fresca de *Vriesea hieroglyphica* em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura

Quanto à produção de massa seca, observou-se interação significativa entre as doses de N e Mg somente para *V. carinata* (Figura 19). Observa-se por meio da superfície de resposta, que o acúmulo de massa seca segue as mesmas características do acúmulo de massa fresca (Figura 15), sendo que a maior produção foi obtida com a dose de N de 336 mg L⁻¹ combinada com a de Mg de 18 mg L⁻¹ e a menor produção foi observada na combinação da mais alta dose de Mg com a mais baixa de N.

$$Y = 0,086 + 0,001N - 0,002Mg - 0,000002N^2 - 0,000009NMg + 0,00004Mg^2 \quad (R^2 = 0,22)$$

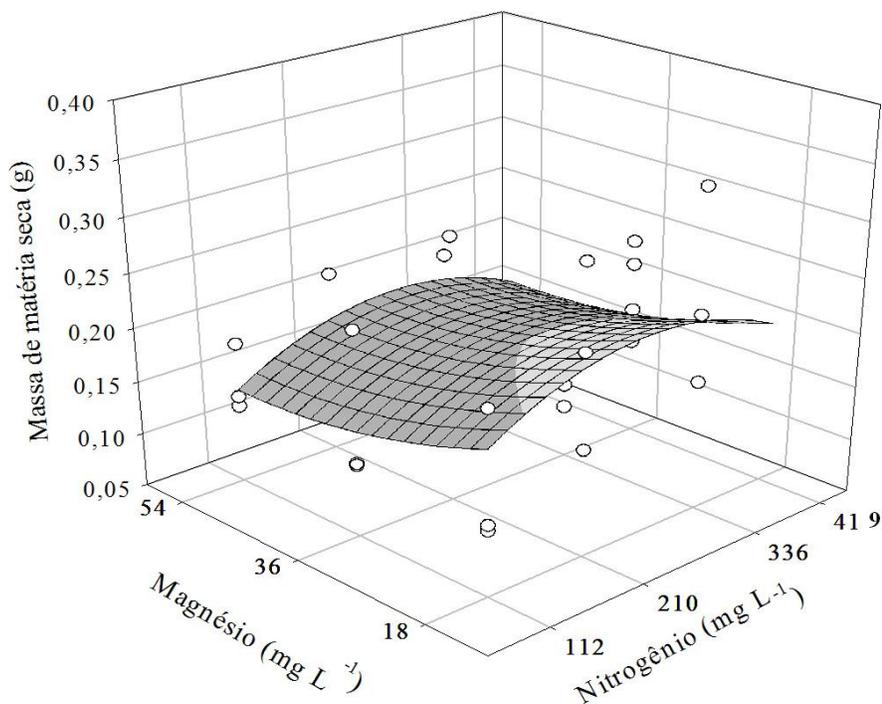


Figura 19 - Produção de massa de matéria seca de *Vriesea carinata* em função das combinações de doses de nitrogênio (N) e de magnésio (Mg) no meio de cultura

Com base nas análises das superfícies de resposta, pode-se inferir que as espécies têm diferentes exigências nutricionais em termos de N e Mg.

Das espécies analisadas, *V. friburgensis*, *V. simplex* e *V. hieroglyphica* produziram maior quantidade de massa matéria fresca mediante suprimento de doses altas de Mg, enquanto que *V. carinata* o fez com suprimento de dose mais baixa deste nutriente (18 mg L⁻¹). Deve-se observar, também, que para *V. carinata* e *V. hieroglyphica* a dose de N de 336 mg L⁻¹ foi necessária para garantir a maior produção de massa de matéria fresca. Já para a espécie *V. simplex* a dose de N de 112 mg L⁻¹ foi suficiente para garantir a máxima produção e para *V. friburgensis*, a dose de N de 210 mg L⁻¹ proporcionou maior acúmulo de massa de matéria fresca.

Para a espécie *V. carinata* e *V. hieroglyphica*, as doses de N e Mg utilizadas nos tratamentos controle (419 mg L⁻¹ e 36 mg L⁻¹, respectivamente) acarretaram em um acúmulo de massa fresca situada na região da superfície de resposta contendo os maiores

valores. Por outro lado para *V. friburgensis* e *V. simplex*, essas doses causaram redução na produção de biomassa fresca.

A análise dos teores de nutrientes nas folhas das espécies de *Vriesea* cultivadas *in vitro*, mostram que para *V. carinata*, *V. friburgensis* e *V. hieroglyphica*, os teores de N e Mg na folha se mantiveram proporcionais às doses fornecidas nos tratamentos sendo que, para *V. carinata*, quanto maior o teor de N na folha, maior o de Mg, com exceção do tratamento oito. Para as demais espécies, os teores de N e Mg nas folhas das plantas não seguiram a proporção das doses fornecidas, sendo que em todos os tratamentos os teores foram semelhantes (Tabela 6). Em *V. carinata*, os controles, que receberam doses maiores de N, também apresentaram teores mais altos deste nutriente. Em *V. friburgensis* e *V. hieroglyphica* ocorreu o inverso. Para todas as espécies os controles apresentam teores de cálcio mais elevados que nos tratamentos.

Tabela 6 - Teores de nutrientes (mg kg^{-1} de matéria seca) em folhas de cinco espécies de *Vriesea* cultivadas em meio de cultura contendo nove diferentes combinações de doses de nitrogênio e magnésio (em mg L^{-1}) e dois controles, C1 e C2.

<i>V. carinata</i>											
Tratamento (Doses de N:Mg)	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	Mg	N	P	S
1 (112:18)	21,8	4,6	1192,6	217,4	146,5	4,0	24,4	1,2	30,4	7,5	2,7
2 (112:36)	31,3	6,8	1470,0	192,1	173,5	3,7	31,0	2,8	36,1	9,5	3,3
3 (112:54)	27,3	6,3	1313,3	220,8	201,8	4,7	33,6	4,4	35,2	10,0	4,0
4 (210:18)	28,0	7,0	1295,3	209,6	212,2	3,9	26,9	1,6	39,0	8,5	3,6
5 (210:36)	24,2	8,6	1461,2	207,7	207,6	3,4	26,5	2,9	42,7	8,3	3,2
6 (210:54)	21,3	6,8	1043,5	180,6	222,4	4,3	31,6	4,0	46,6	9,9	4,0
7 (336:18)	26,8	6,1	1117,1	169,0	230,7	3,0	20,4	1,4	44,8	7,4	3,8
8 (336:36)	16,6	6,0	888,3	163,3	190,7	4,4	24,1	2,4	34,8	7,7	4,0
9 (336:54)	18,5	8,1	1121,8	168,6	175,9	3,8	22,6	3,4	45,1	8,7	3,8
C1 (419:36)	16,3	3,3	1004,9	72,1	147,3	12,2	29,7	1,9	49,4	8,6	4,2
C2 (419:36)	19,5	8,3	1110,1	94,5	165,3	14,5	33,9	2,0	51,4	9,7	5,2

<i>V. friburgensis</i>											
Tratamento (Doses de N:Mg)	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	Mg	N	P	S
1 (112:18)	35,4	4,3	1281,0	211,3	162,6	4,8	25,3	1,6	40,8	5,8	2,3
2 (112:36)	38,3	4,6	1916,7	170,2	162,4	4,8	29,7	3,2	42,4	7,5	2,6
3 (112:54)	33,4	5,2	1525,0	224,3	163,4	4,3	30,3	3,6	43,1	7,9	2,9
4 (210:18)	31,9	4,8	1300,6	207,6	170,4	4,1	28,1	2,5	42,4	7,6	2,7
5 (210:36)	33,5	5,1	1146,6	171,8	152,5	5,1	36,8	3,2	58,1	10,9	2,6
6 (210:54)	34,4	4,7	1655,4	210,9	144,9	3,7	21,4	3,2	42,9	6,4	2,6
7 (336:18)	33,6	4,8	1444,6	179,4	184,1	4,5	22,9	1,8	61,0	7,7	2,8
8 (336:36)	38,3	4,4	1319,1	135,7	137,0	3,8	20,5	2,4	57,5	7,0	2,5
9 (336:54)	40,3	4,8	1626,3	139,2	140,7	3,8	21,5	3,5	63,8	7,2	2,8
C1 (419:36)	31,2	4,1	1964,9	166,7	119,3	14,7	19,3	1,5	45,8	4,3	2,7
C2 (419:36)	33,6	7,0	2789,3	115,8	118,8	12,5	20,4	1,5	31,8	4,6	6,9

Continua

Continuação

<i>V. paraibica</i>											
Tratamento (Doses de N:Mg)	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	Mg	N	P	S
1 (112:18)	27,2	7,2	996,2	215,2	179,6	7,3	44,7	1,7	47,8	9,0	4,1
2 (112:36)	25,1	5,5	897,6	205,8	124,6	4,2	33,9	1,7	35,6	7,0	3,6
3 (112:54)	28,4	6,3	926,5	243,7	136,6	3,9	37,4	3,1	40,4	7,9	3,6
4 (210:18)	24,9	6,7	1163,1	236,0	152,8	4,1	33,1	1,8	42,0	8,5	4,0
5 (210:36)	27,9	8,8	1208,5	212,8	179,4	4,3	36,0	2,4	41,1	8,9	4,6
6 (210:54)	34,1	7,7	1294,7	291,7	176,3	5,7	43,8	3,8	41,4	9,7	4,9
7 (336:18)	28,2	9,8	1851,6	389,4	259,1	8,2	49,8	2,8	59,3	13,3	5,7
8 (336:36)	24,5	7,5	969,3	234,3	164,0	4,9	31,2	2,2	47,6	7,4	4,2
9 (336:54)	28,2	7,1	1199,5	229,4	153,9	5,1	39,5	3,1	48,7	9,1	4,6
C1 (419:36)	28,9	4,7	819,4	163,3	125,1	12,4	34,5	1,9	48,8	6,1	4,7
C2 (419:36)	22,3	7,9	771,1	150,9	136,0	14,9	35,5	1,7	43,8	7,8	5,1

<i>V. simplex</i>											
Tratamento (Doses de N:Mg)	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	Mg	N	P	S
1 (112:18)	47,3	5,7	919,5	220,9	149,6	6,9	25,8	1,2	39,3	8,3	2,9
2 (112:36)	34,8	5,4	811,8	190,9	167,0	5,1	25,8	2,1	37,9	7,4	3,1
3 (112:54)	30,3	5,5	768,0	125,4	139,7	5,4	24,4	2,7	35,9	8,1	2,9
4 (210:18)	46,3	9,0	1298,9	251,7	170,3	7,4	19,6	1,5	32,5	9,9	3,5
5 (210:36)	46,8	6,4	1078,0	210,6	198,5	6,1	26,7	2,5	37,1	9,8	3,8
6 (210:54)	41,5	6,1	918,2	180,3	133,1	6,8	21,0	2,4	48,3	8,3	3,0
7 (336:18)	50,2	8,3	1253,7	246,2	207,4	10,0	34,1	1,8	50,9	10,8	4,2
8 (336:36)	41,5	7,0	1208,5	291,2	215,1	9,1	32,9	2,7	47,8	12,4	4,7
9 (336:54)	41,9	6,2	1205,2	209,2	173,3	7,1	26,9	2,7	53,5	9,3	3,5
C1 (419:36)	36,1	4,0	1113,1	90,3	155,0	13,7	25,0	1,4	53,5	8,1	4,2
C2 (419:36)	30,6	5,0	769,0	103,1	105,2	13,7	24,5	1,1	60,8	6,0	3,1

Continua

Conclusão

<i>V. hieroglyphica</i>											
Tratamento (Doses de N:Mg)	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	Mg	N	P	S
1 (112:18)	25,4	4,1	690,7	153	131,9	4,2	20,7	1,5	41,3	6,4	1,5
2 (112:36)	37,4	5,2	1196	190,6	148,5	5,8	37,4	3,1	41,7	9,3	2,1
3 (112:54)	36,3	5,1	878,5	178,1	133,8	5,9	36,3	3,6	48,0	10,4	2,2
4 (210:18)	42,4	5,1	804,7	224,3	145,1	6,1	30	1,9	51,5	9,7	2
5 (210:36)	34,7	4,8	660,7	160,2	114,6	5	29,5	2,2	59,0	8	1,9
6 (210:54)	38,7	6,5	1384,9	232,5	183,1	7,9	42,6	4,9	55,0	12,7	3
7 (336:18)	38	6	1406,2	236	183,5	6,5	34	1,9	63,9	9,8	2,8
8 (336:36)	31,2	4,6	849	185,7	134,5	6,1	28,6	2,5	53,8	8,6	2,1
9 (336:54)	42,8	5,7	959,2	206,5	157	7,0	31,9	3,8	65,7	10,1	2,6
C1(419:36)	34,9	7,2	2487,2	128	148	12,7	50,7	2	44,7	7,5	1,8
C2 (419:36)	35,1	7,6	3039,6	138,8	146,4	11,3	45,6	1,8	35,4	6,5	2,1

C1 corresponde ao meio M4 (ARANDA-PERES et al., 2009)

Com relação aos outros nutrientes, destaca-se para *V. carinata*, o teor de Cu mais baixo para C1 e o teor de S (enxofre) levemente superior em C2. Para *V. carinata* e *V. paraibica*, apesar de C1 ter recebido maior dose de Fe, as plantas dos dois tratamentos controle apresentaram os menores teores deste nutriente. Para *V. friburgensis*, pode-se destacar os teores de Cu e S mais altos em C2 e de ferro mais alto nos dois controles. Para *V. paraibica*, o teor de Cu é menor em C1, que recebeu dose menor deste nutriente e o teor de B (boro) é maior no tratamento 6. Para *V. hieroglyphica*, o teor de Cu é mais alto e semelhante em ambos os controles e os teores de Fe dos controles são bem superiores quando comparados aos demais tratamentos.

Com base nas superfícies de resposta, há relatos na literatura de respostas diferenciadas em relação ao incremento do suprimento de nitrogênio no meio de cultura, sendo que em alguns casos foi observado aumento no crescimento da planta (RUSSOWSKI; NICOLOSO, 2003), em outros a quantidade de N não interferiu no crescimento (GOMES; SHEPHERD, 2000) e ainda, houve casos em que a maior quantidade de N acarretou em redução no crescimento (EVANS, 1993). Essas respostas variaram conforme a espécie de planta utilizada e a fonte de N utilizada.

Kanashiro (2005), trabalhando com *Aechmea blanchetiana*, verificou que a altura da plântula decresceu linearmente com o aumento de N no meio de cultura, no intervalo

de 7,5 a 120 mmol L⁻¹ (no meio M4 a concentração de N é de 29,9 mmol L⁻¹), bem como o crescimento em largura das folhas com níveis do nutriente superiores a 50 mmol L⁻¹. Com relação ao número de folhas, o incremento da concentração de nitrogênio, acarretou em aumento na quantidade de folhas. Ademais, a massa de matéria fresca diminuiu linearmente com o aumento da quantidade de N, da mesma maneira como relatado por Grossi (2000), que observou a mesma resposta para *A. nudicaulis*, considerando o intervalo de doses de N de 1,78 a 30 mmol L⁻¹. O mesmo ocorre com a massa de matéria seca das plântulas. Considerando esse aspecto, Grossi (2000) não verificou diferença significativa com o aumento de N no meio de cultura.

Kanashiro (2005) afirmou que a concentração ideal de N para o crescimento *in vitro* de *A. blanchetiana* em meio MS foi de 7,5 mmol L⁻¹ que promoveu a maior produção de massa seca e fresca. Além disso, foi relatado por este autor que concentrações maiores de N no meio mostraram-se excessivas.

Por termos observado interação significativa das doses de N e Mg para acúmulo de matéria fresca nas espécies de *Vriesea* estudadas (com exceção de *V. paraibica*) e o mesmo não ocorrer para acúmulo de matéria seca (com exceção de *V. carinata*), é possível inferir que as doses estudadas influenciaram em outros fatores fisiológicos. Aparentemente, o estado nutricional da planta pode interferir na absorção de água pela alteração do potencial osmótico celular. Esse fato já foi verificado por Lima Filho e Malavolta (1997) em plantas de *Stevia rebaudiana* com deficiência em K (potássio) que apresentavam menor teor de água nas células. Lin e Yeh (2008), trabalhando com *Guzmania lingulata*, verificaram que o teor de água no parênquima aquífero e espessura total das folhas aumentaram quando a concentração de K fornecido era maior. Assim, o K regula o potencial osmótico das células (TAIZ; ZEIGER, 1991), desta forma podendo, de fato, contribuir para a maior produção de matéria fresca dos tecidos. Com a diminuição da absorção de Ca nos tratamentos em comparação com os controles (discutido adiante, Tabela 6) pode ter ocorrido efeito interiônico de inibição competitiva, aumentando a absorção de K, e assim, também a de água. Esse fato é bastante evidente para a espécie *V. friburgensis*, por exemplo, na qual os teores foliares de K nos controles, nos quais a absorção de Ca é maior, varia de 19,3 a 20,4 mg L⁻¹ e nos tratamentos, nos quais os teores foliares de Ca são menores, os teores de K variam de 20,5 a 36,8 mg L⁻¹.

Com relação aos teores dos nutrientes nas folhas, Kanashiro (2005) afirmou que a concentração dos elementos nos tecidos é frequentemente proporcional à concentração inicial destes no meio de cultura. Como foi citado anteriormente, alguns elementos seguem esta tendência em algumas espécies (teor de cobre mais baixo no C1 de *V. carinata*, por exemplo) e, para outros, não há uma proporção entre a quantidade do elemento fornecido e o seu teor na planta (teor de ferro mais baixo no C1 de *V. paraibica* e *V. carinata*).

Kanashiro (2005) relatou que o teor de N nas folhas de *Aechmea blanchetiana* ajustou-se ao modelo quadrático de regressão com o incremento deste elemento no meio de cultura no intervalo de 7,5 a 120 mmol L⁻¹, sendo que o teor mais alto de N foi obtido com o maior suprimento.

Para todas as espécies, o maior destaque se dá ao teor de Ca (cálcio) nas folhas das plantas, sendo que nos dois controles, com concentrações de N e Mg iguais ao do meio M4 (ARANDA-PERES et al., 2009), o teor deste nutriente é cerca de duas a três vezes maior em relação aos demais tratamentos, com valores entre 11,3 e 14,9 mg.kg⁻¹. Considerando que Aranda-Peres et al. (2009) observaram que a maior quantidade de Ca no meio de cultura M4, que resultou em maior teor de Ca nas folhas das plântulas, foi responsável por maior acúmulo de massa fresca e seca, a diferença não significativa entre os tratamentos deste experimento para as variáveis massa de matéria seca e fresca, pode ter ocorrido por uma menor absorção de Ca quando são fornecidas à planta combinações diferentes de doses de N e Mg daquelas do meio M4.

Os teores encontrados de N apresentaram valores mais altos do que os encontrados no meio M4 (neste caso, variando entre 35 e 38 mg kg⁻¹). Chama-se atenção para este resultado, visto que menos N foi fornecido para as plantas no presente estudo. Ainda em comparação ao meio M4 do estudo de Aranda-Peres et al. (2009), as plantas do presente experimento apresentaram teores de P mais altos que os encontrados no referido trabalho, no qual situou-se próximo a 2 mg kg⁻¹, teores de K mais baixos (no trabalho daqueles autores variou de 42 a 45 mg kg⁻¹), teores mais baixos de Cu embora a concentração fornecida deste nutriente tenha sido maior no presente trabalho e teores de Fe mais altos na maioria dos tratamentos, embora este nutriente tenha sido fornecido em menor quantidade ao meio de cultura. As espécies *V. friburgensis* e *V. hieroglyphica*, que foram estudadas em ambos os trabalhos, apresentaram no presente estudo o mesmo

comportamento das outras espécies, diferindo do comportamento das mesmas no trabalho de Aranda-Peres et al. (2009).

Aranda-Peres et al. (2009) observaram que maiores doses de Ca no meio de cultura M4 proporcionaram não somente um maior crescimento das plântulas, como também uma maior absorção de outros nutrientes. Isso poderia explicar os teores mais baixos de potássio e cobre encontrados nas plantas utilizadas neste experimento, já que teores mais baixos de Ca foram absorvidos.

O objetivo principal do presente trabalho era diminuir a dose de N e aumentar a de Mg, a fim de ajustar os níveis foliares destes nutrientes às recomendações para Bromeliaceae, apresentados por Mills e Benton-Jones (1996). Entretanto, o teor de N encontrado nas folhas das plântulas foi maior em relação àqueles observados por Aranda-Peres et al. (2009). Os teores de Mg mantiveram-se semelhantes aos encontrados por esses autores, indicando que as doses avaliadas destes nutrientes não causaram efeitos positivos no crescimento *in vitro* das espécies de *Vriesea*. Como já foi dito, isso pode ter ocorrido pela queda no teor de Ca nas folhas destas plantas o que acabou afetando a absorção dos demais nutrientes, sendo que o meio M4 apresenta um desempenho superior na propagação *in vitro* destas plantas.

Aranda-Peres et al. (2009) afirmam que os maiores teores de Ca na planta acarretaram em maiores teores de outros nutrientes, principalmente de N, K, Zn (zinco), Mn (manganês) e B. No presente trabalho, somente para o K em *V. hieroglyphica* este comportamento foi observado. Em *V. simplex*, apenas o teor de N foi maior nas plantas provenientes do tratamento controle e, para *V. carinata*, os teores de N e K. Os demais nutrientes citados por aqueles autores apresentaram teores menores ou semelhantes ao de nossas plantas controle (com maiores teores de Ca) e às plantas dos demais tratamentos de todas as espécies. Isso pode explicar o fato de que, mesmo possuindo maiores teores de Ca, as plantas provenientes dos tratamentos controle obtiveram acúmulo de massa de matérias fresca e seca semelhante às plantas dos outros tratamentos, já que os aspectos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento destes atributos necessitam de todos os nutrientes.

Segundo Hepler (2005), o Ca é um importante regulador celular, controlando o desenvolvimento e crescimento nas plantas e atuando como mensageiro secundário juntamente com proteínas. O Ca também desenvolve um papel importante na

determinação da estrutura rígida da parede celular, estabiliza as camadas bilipídicas da membrana celular através de associação com fosfolipídeos provendo sua integridade e está envolvido no controle da permeabilidade da membrana. As plantas são capazes de responder a estímulos diversos por meio da modulação da concentração de Ca. Além disso, os íons Ca^{2+} são utilizados na síntese de parede celular e são utilizados no fuso mitótico durante a divisão celular (TAIZ; ZEIGER, 1991).

Benzing (2000), em trabalho com *Tillandsia paucifolia*, encontrou teores dos nutrientes semelhantes nas folhas das plantas provenientes tanto de ambiente oligotrófico e eutrófico e também valores semelhantes aos do presente estudo. Verificou que o exemplar eutrófico apresentava teores críticos de N e bem próximo do teor encontrado no exemplar oligotrófico, indicando que essa espécie de bromélia está adaptada à escassez de nutrientes e não absorve nutrientes além do necessário.

Os íons interagem entre si, de modo que a absorção de um dado elemento pode receber interferência pela presença de outro. Esse efeito interiônico de absorção pode ser classificado como antagonismo, inibição competitiva ou não competitiva e sinergismo. No primeiro caso, a presença de um elemento inibe a absorção de outro, evitando a toxicidade pelo segundo elemento. Na inibição, ocorre a diminuição da absorção de um elemento pela presença de outro íon, podendo ser competitiva (quando os elementos têm o mesmo sítio ativo do carregador) ou não-competitiva. Para o sinergismo, a presença de um elemento aumenta a absorção de outro (MALAVOLTA, 1980; MALAVOLTA et al., 1997). No presente estudo, as superfícies de resposta de *V. friburgensis* e *V. simplex* revelam que estas espécies apresentaram o menor acúmulo de matéria fresca quando foram fornecidas às plântulas doses baixas de Mg com doses altas de N. Para *V. carinata* e *V. hieroglyphica* o menor acúmulo é obtido com doses baixas de N e altas de Mg combinadas. Esse fato poderia indicar que o NH_4^+ e o Mg^{2+} competem pelos mesmos sítios de absorção – efeito inter-iônico de inibição competitiva. Entretanto, os teores de ambos os elementos encontrados nas folhas refutam essa hipótese, uma vez que aumentaram proporcionalmente com as doses fornecidas (isto é, quando as doses de N e de Mg foram altas, os teores foliares seguiram o mesmo padrão). Kanashiro (2005) verificou que o teor de Mg nas folhas de *A. blanchetiana* decresceu linearmente conforme o aumento na quantidade de N suplementada ao meio de cultura, sendo que o menor teor de Mg ocorreu com a dose máxima de N. Sarmiento et al. (1994), em trabalho com

oliveiras, verificaram um incremento no teor de Mg proporcional ao aumento na concentração de N no meio, no intervalo de 0 a 20 mmol L⁻¹.

Kanashiro (2005) verificou que com o aumento na quantidade de N fornecida, os teores de Cu, N e K aumentaram nas folhas, enquanto que os teores de B, Mn e Zn sofreram decréscimo. Já os teores de Fe, P (fósforo) e Ca não sofreram alterações com incremento de nitrogênio no meio de cultura. No presente estudo não se verificou uma relação entre o teor dos nutrientes citados e o aumento do suprimento de N, sendo que o teor dos nutrientes mostrou leve variação entre os tratamentos (com exceção dos controles) sendo que, aparentemente, o fator variabilidade entre as plântulas afetou mais do que o suprimento dos nutrientes. Além disso, no presente estudo houve variação concomitante no suprimento de Mg, sendo que não é possível verificar a ação do N sozinho.

Além da interação entre os íons (efeito inter-iônico de absorção), há uma série de fatores que interferem na absorção dos nutrientes por plântulas cultivadas *in vitro*. Dentre estes se destacam a composição química do meio, estado nutricional da planta e condições físicas do ambiente de cultivo (WILLIAMS, 1991). Além disso, em nosso experimento foi utilizado meio de cultura solidificado com agar. Sabe-se que o agar não possui uma composição mineral muito bem definida, fator que pode ter interferido nos resultados obtidos. Ademais, no meio solidificado com agar, a disponibilidade de água e dos minerais pode estar afetada, causando desequilíbrio entre os nutrientes e, por sua vez, indisponibilidade dos mesmos para o vegetal (DEBERGH, 1983). Entretanto, abordagens similares às utilizadas no presente estudo foram utilizadas por Monteiro et al. (2000) com maracujá e Aranda-Peres et al. (2009) com espécies de *Vriesea*, para determinação de meio de cultura mais adequado para estas culturas.

Em estudos futuros, a fim de se otimizar a propagação destas espécies *in vitro*, pode-se avaliar a utilização de meio líquido, que além de evitar os problemas supracitados, permite a absorção de nutrientes também pelas folhas. Sabe-se que as epífitas são capazes de absorver nutrientes pelas escamas foliares e que este se constitui no principal meio de nutrição das mesmas. Então, esse aspecto também deve ser levado em conta, como sugerido por Endres; Mercier (2003). Outro fator a ser abordado é a utilização de N em forma orgânica. Estudos nesse sentido já vêm sendo realizados e tem-se que, muitas vezes, o nitrogênio orgânico (na forma de uréia ou aminoácidos) acarreta

em maior acúmulo de massa fresca pelas plantas epífitas quando em comparação com as formas inorgânicas (MERCIER et al., 1997; ENDRES; MERCIER, 2001; 2003). Outro fator a ser testado é a utilização de um intervalo mais amplo de doses de N e Mg, buscando-se obter resultados e resposta mais precisas.

5.4. Aclimatização

As plantas, ainda *in vitro* e sob os tratamentos com e sem AIB no meio de cultura, apresentaram diferenças quanto à presença de raízes, sendo que as que passaram pelo meio com AIB apresentavam raízes bem formadas e as provenientes de meio de cultura sem o regulador de crescimento vegetal, não as tinham (Figura 20).

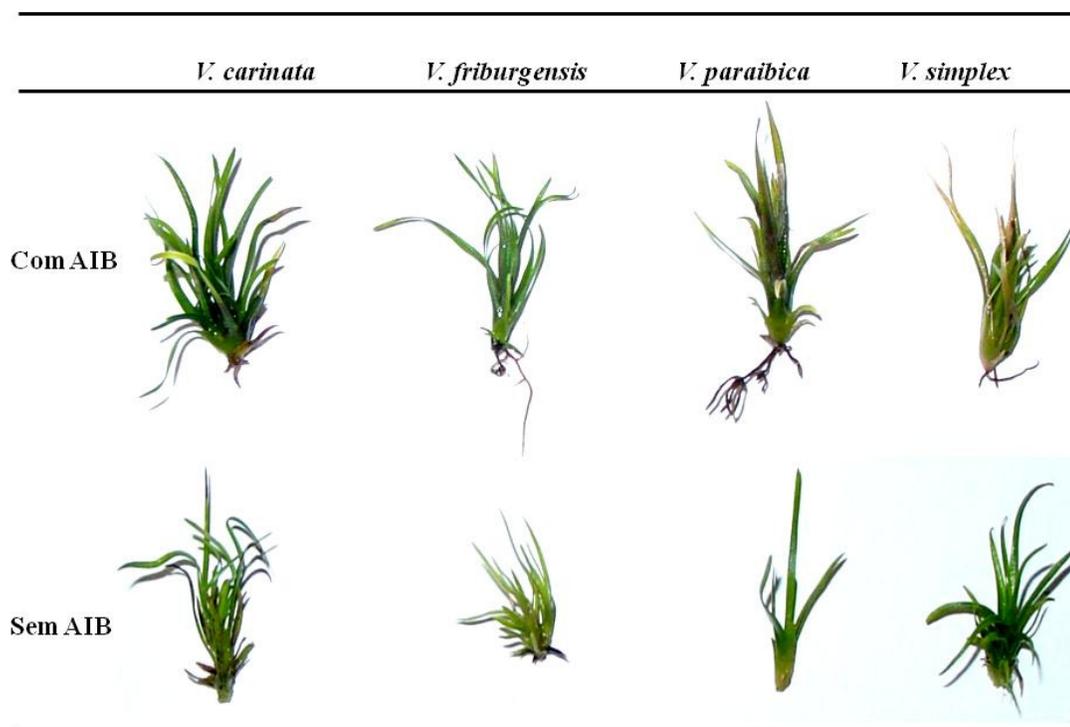


Figura 20 - Plântulas de espécies de *Vriesea* provenientes de meio de cultura com ou sem AIB, anteriormente à aclimatização

Durante o período avaliado do experimento de aclimatização, as plantas não apresentaram diferenças visíveis de tamanho e características em geral, confirmando, novamente, o crescimento e desenvolvimento lentos de plantas do gênero *Vriesea*. As plantas de todos os tratamentos apresentaram as mesmas características.

No tempo entre a transferência das plantas para as bandejas com os substratos em casa de vegetação e cerca de 20 dias após essa transferência, ocorreu uma infestação pelo mosquito, popularmente conhecido com *Sciara* ou “fungus gnats”, na casa de vegetação. Por se tratar de um viveiro comercial, adaptado para receber plantas jovens que necessitam de elevada umidade e no qual se encontravam outras plantas, o proprietário teve que remediar a infestação e controlar outras contaminações, o que pode ter contribuído ainda mais para a mortalidade das plantas.

Três meses (120 dias) após a transferência das plântulas cultivadas *in vitro* para bandejas contendo três diferentes substratos comerciais, verificou-se a taxa de sobrevivência (Tabela 7).

Tabela 7 - Taxa de sobrevivência de plantas de quatro espécies de *Vriesea* cultivadas *in vitro*, com passagem ou não por meio de cultura contendo ácido indolbutírico (AIB), 120 dias após a transferência das mesmas para bandejas contendo três tipos de substratos comerciais para aclimatização

ESPÉCIES	SUBSTRATOS		
	Com AIB (%)		
	Vivatto ®	Tropstrato ®	Bioplant ®
<i>V. carinata</i>	28	56	44
<i>V. friburgensis</i>	72	40	8
<i>V. paraibica</i>	24	84	44
<i>V. simplex</i>	16	40	28
	Sem AIB (%)		
<i>V. carinata</i>	48	72	68
<i>V. friburgensis</i>	56	80	56
<i>V. paraibica</i>	64	88	80
<i>V. simplex</i>	48	60	64

A taxa de sobrevivência observada foi variável, considerando-se espécies e substratos utilizados, sendo relativamente baixa, em comparação com outros estudos, como o realizado por Aranda-Peres (2005) com *Aechema nudicaulis*, que obtiveram 100% de sobrevivência. Oliveira et al. (2007), trabalhando com *Ananas comosus*, obtiveram 96% de sobrevivência durante a aclimatização das plântulas.

No presente estudo, a alta mortalidade das plantas provavelmente ocorreu pela infestação mencionada.

“Fungus gnats”, ou mosquito de fungos, como são chamados popularmente mosquitos do gênero *Bradysia* (Diptera: Sciaridae) são insetos comuns à produção de plantas em casa de vegetação (HARRIS; OETTING; GARDNER, 1995). Os adultos têm cerca de 2 mm de comprimento, são freqüentes na área imediatamente acima da superfície do substrato e completam seu ciclo de vida em dois ou três dias. As fêmeas depositam em torno de 30 a 70 ovos na superfície do solo. Após a eclosão dos mesmos, quatro estágios larvais se desenvolvem no topo da superfície do solo, seguidos de estágio de pupa. O ciclo de vida inteiro dura aproximadamente 21 dias. Os estágios larvais se alimentam de raízes e fungos. Kennedy (1984) afirma que a larva do mosquito se alimenta naturalmente de fungos, mas se estes não estiverem presentes em quantidades suficientes ao redor das plantas, elas passam a se alimentar de tecidos das raízes, abrindo galeria nas mesmas e as necrosando por completo. Os danos causados nas raízes por estas larvas podem ser bem severos e capazes de prejudicar a produção das plantas (HARRIS et al., 1995). O substrato nos potes que contém alta quantidade de matéria orgânica e de umidade promove o crescimento de algas e fungos proporcionando condições ideais para reprodução do mosquito (EPENHUIJSEN; PAGE; KOOLAARD, 2001). As larvas de algumas espécies de *Bradysia* atacam tecidos saudáveis de plantas de importância econômica como batatas, trigo, alfafa e de plantas ornamentais, como bulbos de tulipas, begônias, gerânios, orquídeas jovens. Esses mosquitos são um problema nas estufas da Flórida, sendo que muitos produtores têm dificuldade em controlar adequadamente esses insetos (MEAD; FASULO, 2001). Problemas com esse mosquito podem vir a ocorrer em condições de umidade alta (MEAD; FASULO, 2001). O sintoma observado nas plantas é o rápido amarelecimento e murchamento, decorrentes da interrupção do suprimento de água e nutriente (OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, 2011). Plantas jovens são especialmente susceptíveis às injúrias causadas pela alimentação das larvas do mosquito (CLOYD; DICKINSON, 2006). Além dos danos diretos causados pelas larvas, estas são ainda vetores de outros patógenos (GILLESPIE; MENZIES, 1993).

Para evitar contaminação por outros patógenos pelas raízes atacadas, foi aplicado dióxido de cloro estabilizado a 7%, da marca comercial Dioxiplus®, nas plântulas e raízes. O dióxido de cloro é utilizado pela sua ação bactericida e fungicida, sendo um desinfetante potente. Para controle biológico do mosquito, foi utilizado o ácaro predador

Stratiolaelaps scimitus (Acari: Laelapidae), da marca comercial Stratiomip®, que se alimenta de larvas e ovos do mosquito.

Assim, em decorrência dos problemas acima elucidados, não foi possível a realização de análises mais precisas e detalhadas visando avaliar o efeito da utilização de AIB no meio de cultura para indução de raízes, anteriormente à transferência das plântulas para o substrato ou o efeito dos substratos no sucesso da aclimatização.

5.5. Análise morfo-anatômica de folhas de quatro espécies de *Vriesea*

Em todas as espécies estudadas a epiderme é uniestratificada, com paredes pouco espessadas e com células de formato elíptico nas folhas provenientes de casa de vegetação. Nas plantas de ambiente *in vitro*, o formato das células epidérmicas é variado, de formas alongadas a elípticas, com contornos geralmente sinuosos. Em ambas as condições de cultivo, a epiderme das duas faces foliares é semelhante com exceção de estômatos que estão presentes apenas na epiderme abaxial (Figura 21).

As escamas estão implantadas na epiderme por um pedículo, constituído de célula de domo mais três ou quatro células apoiadas em duas células basais. As células do pedículo são vivas, e por isso intensamente coradas, de formato quadrado ou retangular, de paredes finas e inseridas na base do escudo (Figura 22).

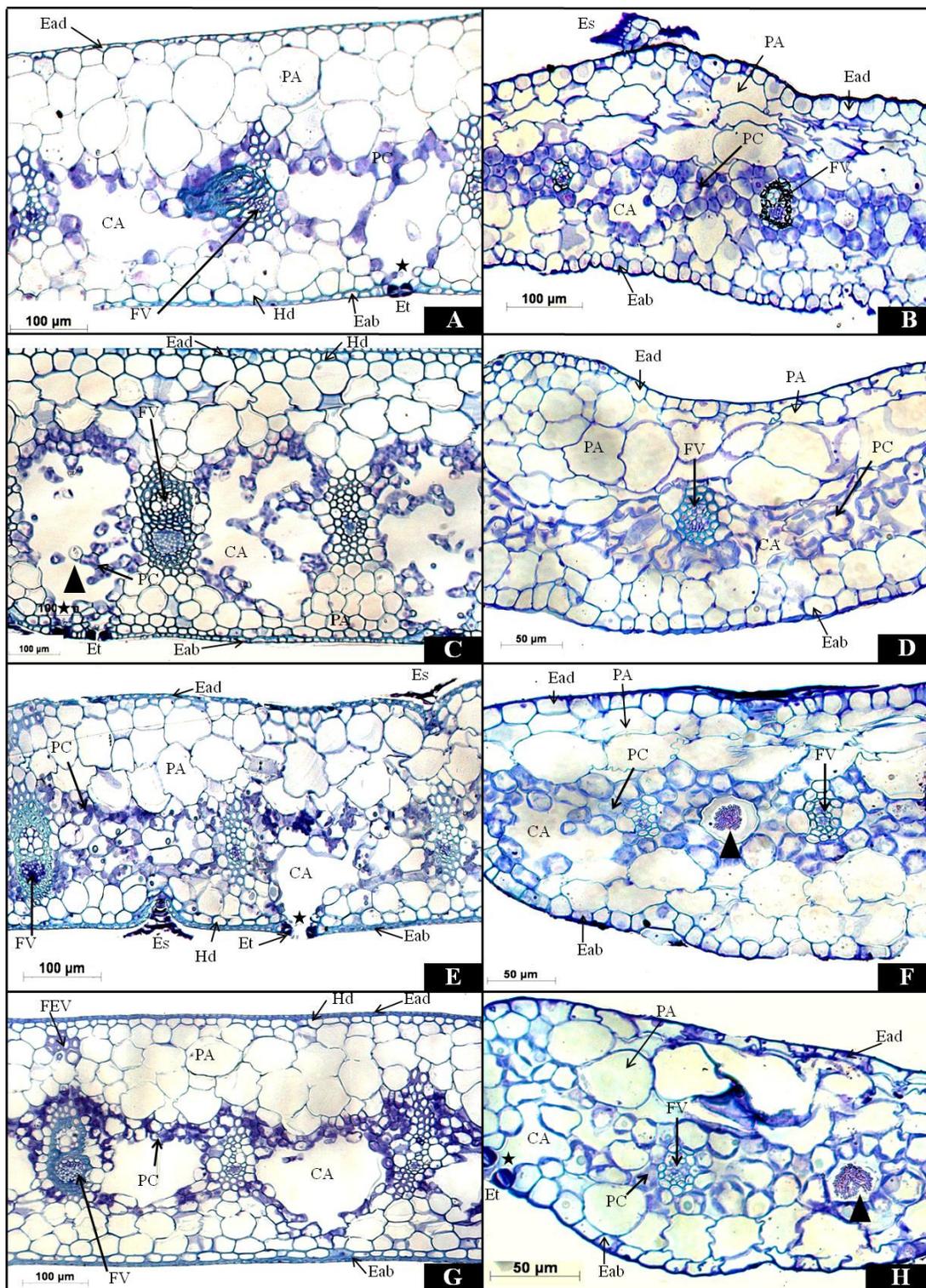


Figura 21 -Seções transversais do mesofilo de folhas de *Vriesea* adultas cultivadas em casa de vegetação (A, C, E, G) e cultivadas *in vitro* em culturas de aproximadamente 1,5 anos (B, D, F, H). *V. carinata* (A, B); *V. friburgensis* (C, D); *V. paraibica* (E, F); *V. simplex* (G, H). CA= canal de aeração; Eab= epiderme abaxial; Ead= epiderme adaxial; Es= esacama; Et= estômato; FEV= fibras extra-vasculares; FV= feixe vascular; Hd= hipoderme; PA= parênquima aquífero; PC= parênquima clorofiliano; cabeça de seta = ráfide; asterisco = câmara subestomática

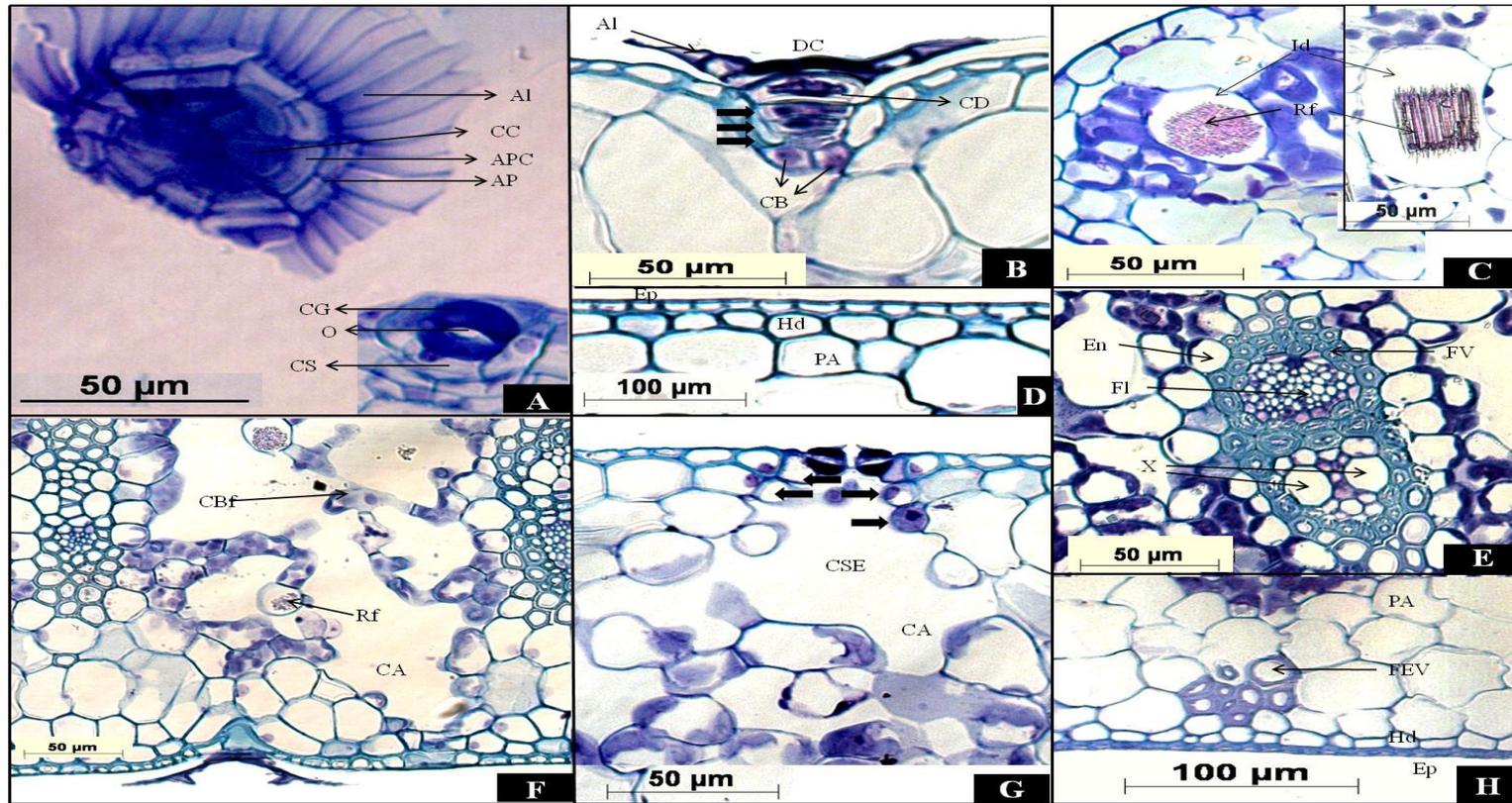


Figura 22 - Detalhes do mesofilo de folhas de *Vriesea* de plantas adultas cultivadas em casa de vegetação e de plântulas cultivadas *in vitro* por cerca de 1,5 anos. Vista frontal de escama e estômato de *V. friburgensis in vitro* (A); Inserção da escama na epiderme de *V. carinata ex vitro* (B). Setas indicando células do pedículo; Idioblasto com ráfide no mesofilo de *V. friburgensis in vitro* em secção transversal e longitudinal (C); Epiderme, hipoderme e parênquima aquífero de *V. friburgensis ex vitro* (D); Feixe vascular em *V. simplex* em casa de vegetação (E); Canais de ar de *V. friburgensis* em casa de vegetação (F); Câmara substomática de *V. carinata ex vitro* (G). Setas indicando células da hipoderme; Fibras extravasculares de *V. simplex* em casa de vegetação (H). Al= ala; AP= anel periférico; APC= anel pericentral; CA= canal de ar; CB= células basais; Cbf= célula braciforme; CC= células centrais; CD= célula do domo; CG= célula guarda; CS= célula subsidiária; CSE= câmara substomática; DC= disco central; En= endoderme; Ep= epiderme; FEV= fibras extra-vasculares; Fl= floema; FV= feixe vascular; Hd= hipoderme; Id= idioblasto; O= ostíolo; PA= parênquima aquífero; Rf= ráfide; X= xilema

As folhas de todas as plantas analisadas na condição *ex vitro* apresentam hipoderme a qual se localiza junto à epiderme das duas faces foliares. A hipoderme é formada por uma camada de células de parede fina, arredondadas e aclorofiladas, como também observado por Proença e Sajo (2007). Já nas folhas de plantas provenientes do ambiente *in vitro*, a hipoderme não foi observada.

Adjacente à hipoderme nas folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação e à epiderme nas folhas de plantas cultivadas *in vitro* encontram-se duas a quatro camadas de células aclorofiladas, arredondadas e com paredes delgadas formando o parênquima aquífero (BARBOZA et al., 2006), também muito mais definido nas folhas de plantas provenientes da casa de vegetação e mais proeminente na face adaxial. Nas plantas de ambiente *in vitro*, as células do parênquima aquífero são maiores e com paredes mais sinuosas e irregulares. Há também um menor número de camadas de parênquima aquífero nas folhas cultivadas nesse ambiente.

O parênquima clorofiliano é formado por células arredondadas (nas folhas provenientes de ambos os ambientes de cultivo) e braciiformes alongadas (SCATENA; SEGECIN, 2005) (somente nas folhas provenientes do ambiente *ex vitro*). O mesofilo das plantas de todas as espécies cultivadas em casa de vegetação apresenta canais de aeração que, na maioria das vezes, são contíguos às câmaras subestomáticas e são atravessadas por diafragmas formados de células braciiformes (SCATENA; SEGECIN, 2005). Nas plantas provenientes do cultivo *in vitro*, esses canais são menos definidos e se limitam a espaços intercelulares menores.

Os feixes vasculares, visíveis também com mais clareza apenas nas folhas provenientes do ambiente *ex vitro*, são denominados colaterais, pois o xilema é voltado para cima e o floema para baixo. Eles se apresentam em única série ao longo da lâmina (PROENÇA; SAJO, 2007). Os feixes de maior porte são circundados de uma a duas camadas de fibras pericíclicas cujas paredes são espessas. Já os feixes de menor porte possuem calotas de fibras pericíclicas apenas nas extremidades. Os feixes vasculares se alternam com os canais de aeração e, geralmente, feixes vasculares de maior porte se alternam com os de menor porte. Os feixes são circundados por uma camada de células parenquimáticas denominada endoderme, que é a camada mais interna desse tecido no mesofilo, constituindo a bainha vascular.

Nas folhas das espécies *V. paraibica* e *V. simplex* cultivadas em casa de vegetação é possível verificar a existência de grupos fibras não associadas ao feixe vascular, localizadas próximas a epiderme adaxial e com paredes lignificadas.

Idioblastos contendo ráfides de oxalato de cálcio são encontrados no parênquima aquíífero e no parênquima clorofiliano do mesofilo em ambas as condições de cultivo, sendo muito mais numerosos nas folhas das plantas de ambiente *in vitro*.

As câmaras subestomáticas são típicas e bem definidas, como em muitas espécies de Bromeliaceae (SCATENA; SEGECIN, 2005) (Figura 22). As câmaras são revestidas, nas *Vrieseas*, por quatro células da hipoderme de parede fina e clorofiladas formando um anel, conforme descrito por Tomlinson (1969).

De modo geral, as folhas cultivadas *in vitro* apresentam uma disposição dos tecidos bem semelhante àquela das folhas de plantas de casa de vegetação, com a diferença de que o mesofilo apresenta-se mais diferenciado nas folhas em casa de vegetação do que *in vitro*. Isso percebe-se também pela formação e organização do sistema vascular e dos canais de aeração, que se encontram muito mais destacados e definidos nas folhas *ex vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos por Calvete et al. (2002), em trabalho com folhas de morangueiro.

As folhas das quatro espécies de *Vriesea* estudadas, *V. carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex*, apresentaram escamas em ambas as faces, adaxial e abaxial, são hipoestomáticas, apresentando células estomáticas dispostas no mesmo nível que as outras células da epiderme, sendo que em muitos casos os estômatos são encobertos pelas escamas.

Em todas as espécies estudadas, na face abaxial das folhas das plantas cultivadas em casa de vegetação, as escamas encontram-se dispostas longitudinalmente no sentido do maior eixo da folha. Na face adaxial em casa de vegetação e nas duas faces *in vitro*, as escamas encontram-se dispostas ao acaso. Em todas as espécies estudadas, as escamas situam-se próximas aos estômatos, o que permite uma menor perda de água (PROENÇA; SAJO, 2004) (Figura 23).

As escamas, a olho nu, apresentam-se como uma cobertura esbranquiçada, dando à folha um aspecto aveludado. Em vista frontal das escamas de todas as espécies, é possível a verificação do escudo, que é composto pelo disco central e pela ala. O disco central é composto de quatro células centrais circundado por dois anéis celulares de oito células cada, sendo o mais interno denominado de pericentral e o externo de periférico. Somente em *V. friburgensis* não foi possível a observação dos dois anéis sendo que nessa espécie foi verificada a presença de somente um anel. O escudo, em todas as espécies e nas duas condições de cultivo e nas duas faces foliares apresenta-se simétrico. A ala é formada por células mais alongadas, periféricas e dispostas radialmente (Figura 24).

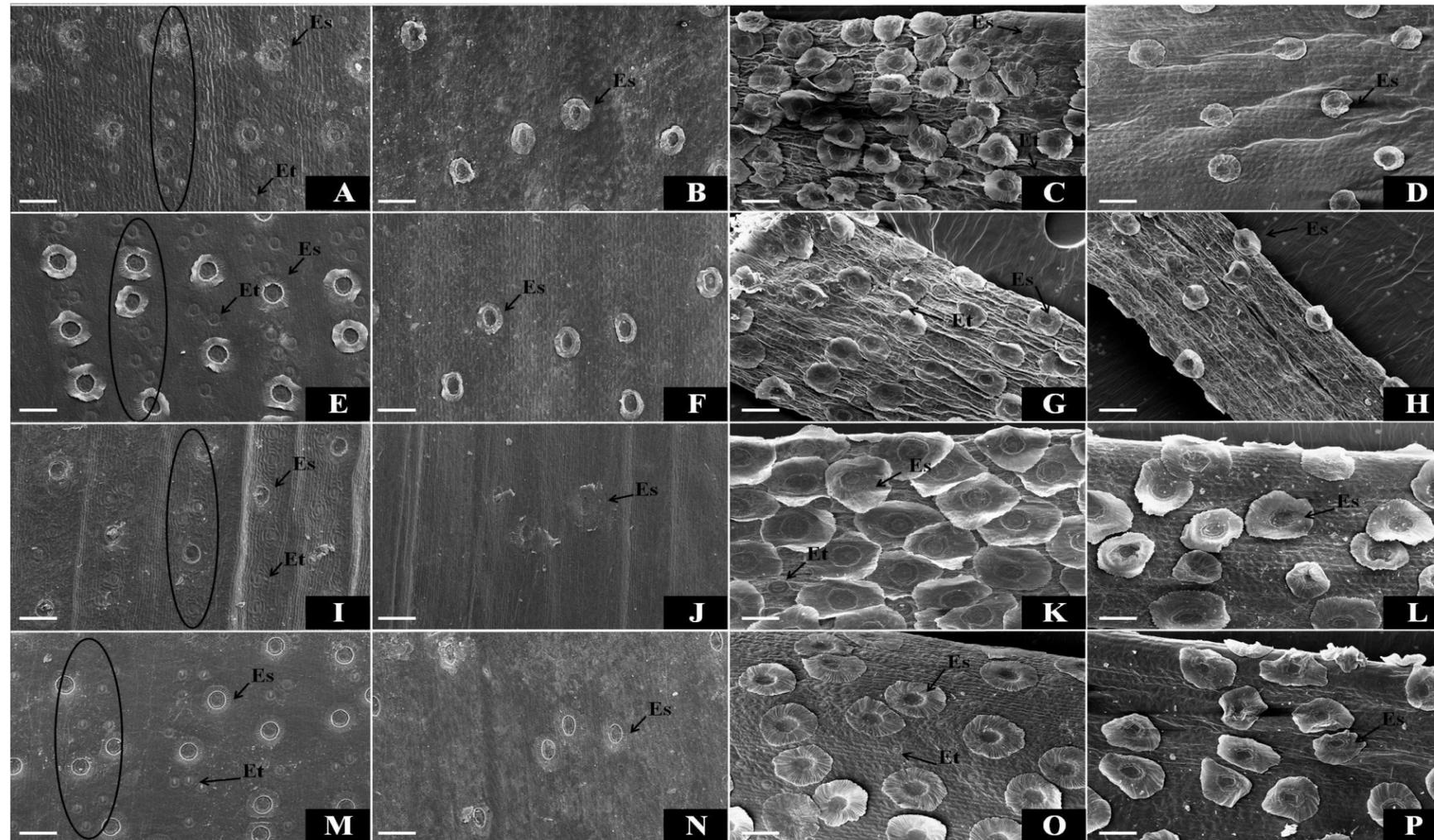


Figura 23 - Morfologia da vista frontal da superfície foliar de plantas de *Vriesea*: *V. carinata* (A, B, C, D), *V. friburgensis* (E, F, G, H), *V. paraibica* (I, J, K, L) e *V. simplex* (M, N, O, P), cultivadas em casa de vegetação, face abaxial (A, E, I, M), em casa de vegetação, face adaxial (B, F, J, N), *in vitro* face abaxial (C, G, K, O), e *in vitro* face adaxial (D, H, L, P). Detalhes mostrando estômatos (Et) e escamas (Es), além da disposição dos estômatos e escamas na face abaxial (). Barras: 100 μ m

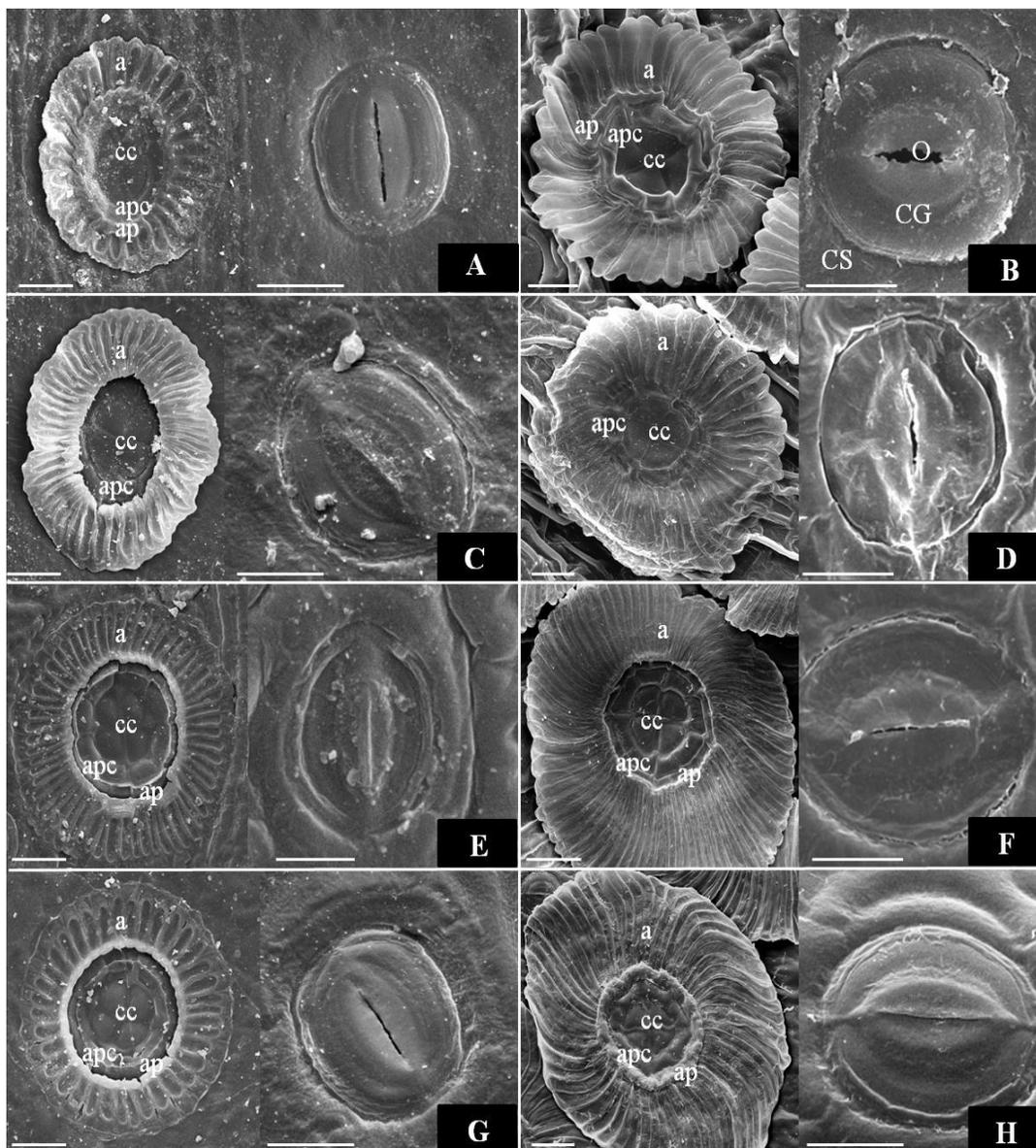


Figura 24 - Vista frontal da morfologia de escamas e estômatos da face abaxial de folhas das espécies de *Vriesea*: *V. carinata* (A, B) *V. friburgensis*, (C, D) *V. paraibica* e (E, F) *V. simplex* (G, H), cultivadas em casa de vegetação (A, C, E, G) e *in vitro* (B, D, F, H). Barras: escama=20 μ m e estômato=15 μ m. a = ala; cc = células centrais; apc = anel pericentral; ap = anel periférico; CG = células-guarda; CS = célula subsidiária; O = ostíolo

As folhas das quatro espécies estudadas, nas duas condições de cultivo, possuem escamas nas duas faces (abaxial e adaxial). A espécie que apresentou o maior número de escamas.mm⁻² foi *V. carinata*, quando cultivada *in vitro* e na face abaxial (35,10). O menor valor para quantidade de escamas foi apresentada por *V. paraibica* quando cultivada sob condições de casa de vegetação, na face adaxial (3,25). Com exceção da *V. simplex*, as demais espécies apresentaram significativamente mais escamas na face abaxial da folha quando cultivadas sob a condição *in vitro*. Para *V. simplex* não houve diferença significativa no número de escamas comparando-se as duas faces foliares. Por outro lado, quando cultivadas em casa de vegetação, a única espécie que apresentou diferença significativa na quantidade de escamas entre as duas faces da folha foi *V. paraibica*, com a face abaxial tendo mais escamas que a face adaxial. Comparando-se as condições *in vitro* e em casa de vegetação, *V. carinata*, *V. friburgensis* e *V. paraibica* apresentaram significativamente mais escamas na face abaxial quando cultivadas *in vitro*. Já na face adaxial, nenhuma espécie apresentou diferença significativa comparando-se as duas situações. *V. simplex* não apresentou diferença significativa no número de escamas nas duas faces foliares, comparando-se as duas condições de cultivo (Tabela 8 e Figura 25).

Tabela 8 - Número médio de escamas/mm² nas folhas das espécies de *Vriesea* nas condições *in vitro* e em casa de vegetação e nas faces abaxial e adaxial.

	<i>V. carinata</i>		<i>V. friburgensis</i>		<i>V. paraibica</i>		<i>V. simplex</i>	
	<i>in vitro</i>	casa de vegetação	<i>in vitro</i>	casa de vegetação	<i>in vitro</i>	casa de vegetação	<i>in vitro</i>	casa de vegetação
Abaxial	35,10aA	8,23bA	19,72aA	11,05bA	19,94aA	8,67bA	13,65aA	11,92aA
Adaxial	8,23aB	5,63aA	8,23aB	8,45aA	8,02aB	3,25aB	11,05aA	6,50aA
CV (%)	35,27							

Médias acompanhadas de mesma letra não apresentam diferença significativa a 5% pelo Teste de Tukey de comparação de médias. Letras maiúsculas comparam nas colunas e letras minúsculas comparam linhas.

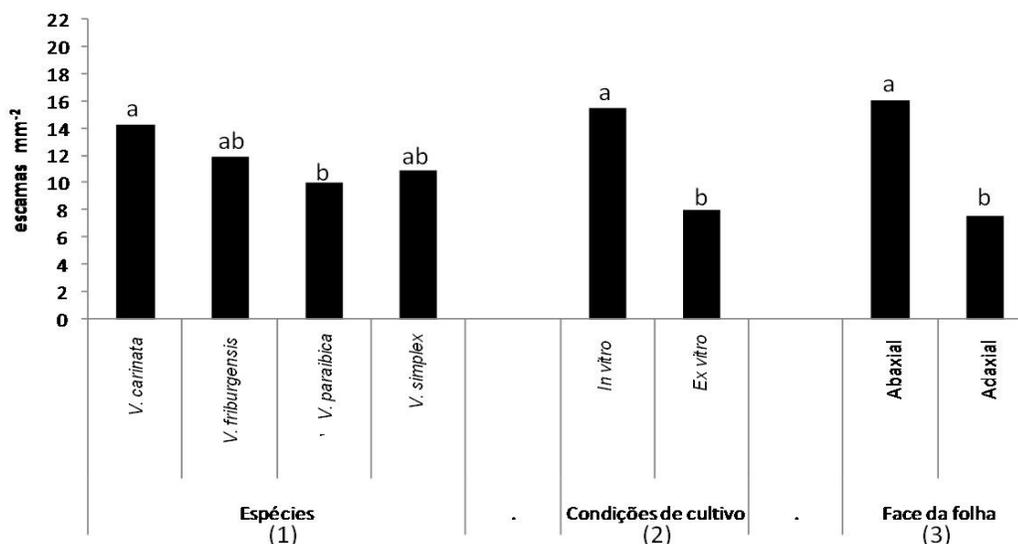


Figura 25 - Número médio de escamas.mm⁻² em folhas de espécies de *Vriesea* (*V. carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex*). Comparação entre as diferentes espécies (1), entre as condições *in vitro* e em casa de vegetação (2) e entre as faces abaxial e adaxial (3), sendo que cada comparação foi realizada independentemente das demais. Médias acompanhadas de mesma letra não apresentam diferença significativa a 5% pelo Teste de Tukey de comparação de médias

No que se refere aos estômatos, as folhas das quatro espécies estudadas, nas duas condições de cultivo, os possuem apenas na face abaxial, sendo, por este motivo, denominadas hipoestomáticas. Em todas as espécies estudadas, na face abaxial das folhas das plantas cultivadas em casa de vegetação, os estômatos encontram-se dispostos longitudinalmente no sentido do maior eixo da folha. Na condição *in vitro*, os estômatos encontram-se dispostos aleatoriamente (Figura 23).

A espécie que apresentou o maior número de estômatos foi *V. friburgensis* sob condição de cultivo em casa de vegetação (33,15) e o menor número de estômatos foi encontrado para *V. paraibica in vitro* (7,58). Comparando-se as condições de cultivo, *in vitro* e em casa de vegetação, todas as espécies apresentaram significativamente mais estômatos quando cultivadas em casa de vegetação do que *in vitro*, indicando que pode haver diferença na taxa fotossintética, de transpiração e de trocas gasosas nas plantas quando cultivadas nos diferentes ambientes (Tabela 9 e Figura 26), o que é esperado dadas as características específicas de cada ambiente (HAZARIKA, 2006).

Tabela 9 - Número médio de estômatos/mm² em folhas de quatro espécies de *Vriesea* nas condições *in vitro* e *ex vitro* e nas faces abaxial e adaxial

	<i>V. carinata</i>		<i>V. friburgensis</i>		<i>V. paraibica</i>		<i>V. simplex</i>	
	casa de <i>in vitro</i> vegetaçã							
Abaxial	19,50bA	27,09aA	13,65bA	33,15aA	7,58bA	20,80aA	17,98bA	27,52aA
Adaxial	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00aB
CV (%)	23,45							

Médias acompanhadas de mesma letra não apresentam diferença significativa a 5% pelo Teste de Tukey de comparação de médias. Letras maiúsculas comparam nas colunas e letras minúsculas comparam linhas.

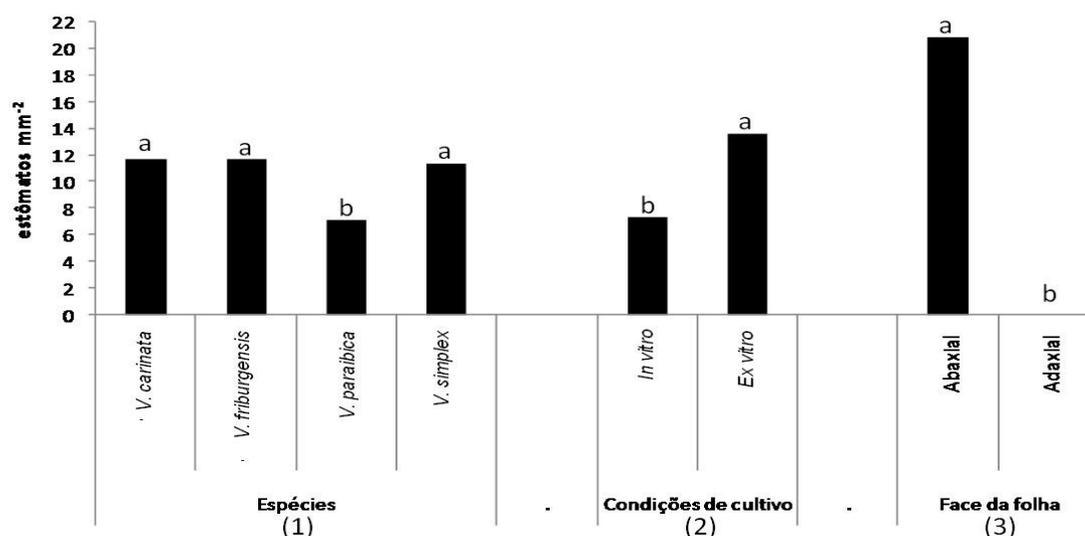


Figura 26 - Número médio de estômatos.mm⁻² em folhas de espécies de *Vriesea* (*V. carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica* e *V. simplex*). Comparação entre as diferentes espécies (1), entre as condições *in vitro* e em casa de vegetação (2) e entre as faces abaxial e adaxial (3), sendo que cada comparação foi realizada independentemente das demais. Médias acompanhadas de mesma letra não apresentam diferença significativa a 5% pelo Teste de Tukey de comparação de médias

Em geral, as espécies que se destacaram significativamente das demais, desconsiderando-se as condições de cultivo e o lado da folha, foram a *V. carinata* com número de escamas total maior que as demais, e *V. paraibica*, com menor quantidade de escamas e de estômatos do que as demais. *V. simplex* e *V. friburgensis* tiveram um número de escamas total intermediário e um número de estômatos estatisticamente igual ao de *V. carinata*.

Não há diferenças morfológicas entre estômatos em folhas provenientes das duas

condições de cultivo. Em ambos os casos, as células-guarda dos estômatos apresentam-se reniformes e o estômato é ovalado em ambas as condições e situam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figuras 22 e 24).

Em folhas cultivadas *in vitro* as escamas apresentam-se mais protuberantes, vistosas, maiores com relação ao escudo e com projeção elevada quando comparadas às escamas das folhas advindas do ambiente de casa de vegetação. Nestas, a ala parece ser bem menor em comparação com as células centrais e de formato mais constante, além de estar mais achatada, em contato com a epiderme (Figura 24).

Neste trabalho, optamos por analisar apenas a parte mediana das folhas das espécies de *Vriesea*. Entretanto, Bittencourt (2000), trabalhando com o mesmo gênero *in vivo*, analisou três diferentes regiões das folhas: apical, mediana e basal. O autor observou que na região basal, as escamas ocorrem em maior número devido à sua localização próxima ao tanque, enquanto que nas outras duas regiões, as escamas são mais escassas. Algumas espécies apresentam maior quantidade de escamas na epiderme abaxial e outras, na epiderme adaxial sendo que esses valores variaram conforme a região da folha analisada. Além disso, Bittencourt (2000) não observou um padrão quanto à disposição das escamas ao longo da folha. Na presente pesquisa, entretanto, foi possível verificar que as escamas se dispõem em fileiras longitudinalmente ao longo do maior eixo da folha (Figura 23), na face abaxial das folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação. Esse mesmo padrão foi observado por Py et al. (1984) em *Ananas comosus*.

Com relação às escamas, Batagin et al. (2009) também verificaram a presença de tricomas escamiformes em ambas as faces das folhas e recobrimo estômatos em *Ananas comosus*. Estes autores verificaram a presença na região mediana das folhas de abacaxi CV IAC “Gomo-de-mel” cultivadas *in vitro* a presença de, em média, 3 escamas.mm⁻² na superfície adaxial e 6 escamas.mm⁻² na abaxial, número baixo quando comparado ao encontrado para as espécies de *Vriesea*. Os autores inferem que a quantidade de escamas varia conforme a exposição das plantas ao sol, sendo que esse valor aumenta com o aumento da incidência solar. Em plantas cultivadas sob pleno sol, as folhas apresentam em média 12 escamas.mm⁻² na face adaxial e 22 escamas.mm⁻² na face abaxial. Arruda e Costa (2003) trabalharam com espécies de *Vriesea* provenientes de campo: *V. bituminosa*, *V. fosteriana*, *V. gigantea*, *V. longiscapa* e *V. triligulata*. Os autores encontraram a quantidade de escamas, na face adaxial, variando de 4,5 a 10,3, conforme a espécie, ou seja, bem próxima da encontrada nas espécies de *Vriesea* cultivadas *ex vitro* no

presente trabalho. Na face abaxial, esse número variou de 13,8 a 20,9, o que é um pouco acima dos valores encontrados nas espécies de *Vriesea* do presente trabalho, cultivadas em casa de vegetação. Esse fato pode ser explicado pela origem das plantas analisadas: as plantas estudadas pelos autores citados são provenientes de campo e submetidas às condições naturais e as do presente estudo são advindas de casa de vegetação, na qual elas são constantemente irrigadas e a luminosidade e calor são menos intensas do que em ambientes naturais.

Pode-se dizer também, que o baixo número de escamas encontrado para o abacaxi em comparação com as espécies de *Vriesea*, pode ser devido à diferença de hábito entre essas plantas. O abacaxi é uma bromélia terrestre, enquanto que as espécies de *Vriesea* são bromélias epífitas. Apesar de condições de luz mais favoráveis, as plantas epífitas enfrentam dois desafios principais: suprimento de nutrientes e água. Para sobreviver ao suprimento de água limitado e irregular, as epífitas desenvolveram adaptações anatômicas (fitotelmo para armazenar água, suculência, velame radicular e tricomas foliares para absorção de água) e fisiológicas (metabolismo CAM e tolerância à seca) (BENZING, 1990). Os tricomas, ou escamas, são reconhecidos como a principal estrutura de absorção de água na maioria das espécies pertencentes à sub-família Tillandsioideae. Evidências para esse fato são baseadas na densidade e morfologia das escamas na superfície foliar. Toda água que entra na planta segue um rota que vai das células da ala, passando pelo anel e disco de células central para as células da base, que são vivas. São também capazes de absorver solutos orgânicos, como aminoácidos, bem como íons (NYMAN et al., 1987). Apesar de algumas bromélias tanque terem a capacidade de absorver nutrientes minerais pelas raízes, as folhas recobertas com escamas representam seu principal meio de entrada (BENZING; BURT, 1970; NIEVOLA; MERCIER 1996). Brighigna et al. (1992), afirmaram que a presença destes tricomas escamiformes ou escamas, permitem às plantas modificar a umidade e temperatura em sua área-foliar, uma vez que as asas das escamas refletem a luz solar (BENZING, 1980), dispersam calor e retêm pequenas gotas de água, criando uma atmosfera saturada de umidade na superfície da folha, evitando a perda de água. A perda de água pelos estômatos também é reduzida pela presença das escamas, uma vez que essas encobrem parte dos mesmos (LARCHER, 2000; BATAGIN et al., 2009).

Escamas de morfologia similar às observadas para as espécies de *Vriesea* neste trabalho são também encontradas em outros gêneros de Bromeliaceae, como observado por

Proença e Sajo (2007) que trabalharam com seis gêneros diferentes e Arruda e Costa (2003) trabalhando com outras espécies de *Vriesea* da seção *Xiphion*.

Segundo Forzza (2001), o número de células do pedículo, e a organização e número das células do escudo têm importância taxonômica na diferenciação de subfamílias e gêneros em Bromeliaceae. Entretanto, esses números podem variar em escamas de uma mesma folha, portanto, esse caractere deve ser utilizado com cuidado (TOMLINSON, 1969).

Com relação aos estômatos, resultados similares também foram encontrados em outros trabalhos. Batagin et al. (2009) verificaram ausência ou raridade de estômatos na face adaxial de folhas de abacaxi cv IAC “Gomo-de-mel”, e abundância dos mesmos na face abaxial. Arruda e Costa (2003) observaram que em *Vriesea triligulara*, *V. longiscapa* e *V. fosteriana*, os estômatos ocorrem no mesmo nível da epiderme. Já em *V. bituminosa*, estes ocorrem levemente acima do nível da epiderme e em *V. gigantea*, levemente abaixo. Proença e Sajo (2007) verificaram estômatos inseridos ao mesmo nível das outras células epidérmicas nas folhas de *Vriesea* sp.

Segundo Scatena e Segecin (2005) a posição dos estômatos em relação às demais células epidérmicas pode estar mais associada a relações filogenéticas do que ao ambiente no qual a planta se encontra. Segundo Mauseth (1988) a presença de estômatos somente na face abaxial é interpretada como uma estratégia para diminuir a perda de água causada pelas correntes de ar que retiram o vapor de água da superfície da folha.

Tomlinson (1969) descreve três classes distintas de estômatos em Bromeliaceae, sendo que as espécies de *Vriesea* aqui estudadas se enquadram na primeira classe, que se caracteriza por estômatos simples e situados ao mesmo nível das células epidérmicas e células-guarda com parede delgada. A segunda e a terceira classe são formadas por estômatos mais especializados em grau crescente de uma classe para outra, com estômatos situados em depressões e células subsidiárias e vizinhas especializadas e células guarda com paredes mais espessas.

Ao contrário do que foi encontrado para as espécies de *Vriesea*, Dousseau et al. (2008) que trabalharam com plantas de ipê, não observaram diferenças na densidade estomática entre plantas produzidas *in vivo* e *in vitro*, mostrando que algumas espécies têm uma maior plasticidade quando transferidas de ambiente do que outras. Já Barboza et al. (2006) afirmam que folhas de *Ananas comosus* cultivados *in vitro* apresentam, em média, 54 estômatos.mm⁻². Em folhas de plantas provenientes de casa de vegetação, esse valor

passa para 62 estômatos. mm^{-2} e plantas adultas em condições de campo apresentam de 70 a 85 estômatos. mm^{-2} . Essas alterações na densidade de estômatos evidenciam a plasticidade fenotípica dessas plantas com relação ao ambiente. Arruda e Costa (2003) encontraram quantidade de estômatos em espécies de *Vriesea* em condições de campo variando entre 25,7 e 46,4. Esses valores podem ser considerados altos quando comparados aos encontrados no presente estudo, o que pode ser, assim como no caso das escamas, devido às condições de campo serem ainda mais adversas que as condições de casa de vegetação.

Com relação às análises realizadas a partir dos cortes histológicos, pode-se afirmar que os resultados apresentados estão de acordo com os encontrados para outras espécies de Bromeliaceae. Arruda e Costa (2003) visualizaram também a epiderme unisseriada nas espécies de *Vriesea* por eles estudadas, com a cutícula variando em espessura.

Em relação ao formato das células epidérmicas, que nas plantas cultivadas em casa de vegetação se apresentam elípticas e *in vitro* em formatos variados e com paredes sinuosas, pode-se inferir que esse fato é devido às condições ambientais nas quais as plantas se encontram. As sinuosidades das paredes de células epidérmicas, segundo Wilkinson (1979) e Gomes (1992), são mais acentuadas em plantas que se desenvolvem em ambientes úmidos e sombreados. Essas características estão de acordo com o ambiente *in vitro*, já que o frasco é saturado de umidade e as luzes artificiais utilizadas na sala de crescimento fornecem menor intensidade luminosa do que em casa de vegetação. Já a curvatura das células epidérmicas otimiza a captação de luz na lâmina foliar, como é o caso das plantas cultivadas em casa de vegetação, que precisam da luminosidade para se desenvolverem.

A presença da hipoderme é uma característica bem marcante dessa família, bem como a presença de parênquima aquífero (AOYAMA; SAJO, 2003; SCATENA; SEGECIN, 2005; SOUZA et al., 2005; BARBOZA et al., 2006; BATAGIN et al., 2009). Segundo Madison (1977), a hipoderme armazena água evitando o colapso das células pelo murchamento e é importante especialmente em plantas com metabolismo CAM auxiliando em sua adaptação ao ambiente sujeitos à escassez de água. Barboza et al. (2006) afirmam que esse tecido pode não ter uma função muito definida no ambiente *in vitro*, pela sua saturação de umidade mas pode ser muito importante no processo de aclimatização, podendo assim, estar relacionado ao alto índice de sobrevivência dos abacaxizeiros quando transferidos para as condições *ex vitro*. No presente estudo, as espécies de *Vriesea*

cultivadas *in vitro* não apresentam hipoderme como nas provenientes de casa de vegetação. Barboza et al. (2006) não encontraram diferença de espessura na hipoderme em folhas de abacaxi provenientes dos dois ambientes de cultivo. Segundo Sajo et al. (1998), a presença de várias camadas de hipoderme constituída de células aclorofiladas e armazenadoras de água é uma característica de plantas xerófitas, encontrada também em espécies dos gêneros *Neoregelia*, *Wittrockia* e *Edmundoa*. De acordo com Tomlinson (1969), a hipoderme das folhas de representantes da família Bromeliaceae é diferenciada em duas regiões: a hipoderme mecânica formada com células de parede espessa e uma hipoderme interna formada de células aclorofiladas e de parede fina, denominada de hipoderme aquífera. Gonzaga e Castro (2008) verificaram que em *Tillandsia pohliana* e *T. aff. tenuifolia* a hipoderme mecânica é bem diferenciada enquanto que em *T. recurvata* esse tecido não é visível. A hipoderme aquífera foi observada pelos autores em todas as espécies estudadas, sendo que em *T. recurvata* este tecido é menos evidente, identificado apenas pelo maior tamanho das células e menor quantidade de cloroplastos quando em comparação com o clorênquima. Proença e Sajo (2007) verificaram a presença de hipoderme mecânica somente em espécies de Bromelioideae e Pitcairnioideae. No presente trabalho foi verificada a presença somente da hipoderme aquífera, conforme as características celulares mencionadas. Pereira et al. (2007) afirma que a definição de hipoderme mecânica ou aquífera só é possível mediante análises ontogenéticas.

O parênquima aquífero predomina na face adaxial das folhas, bem como nos resultados encontrados pelos autores supracitados. Barboza et al. (2006) observaram, ainda, uma diferenciação nítida entre os parênquimas aquíferos e clorofilado nas folhas de plantas cultivadas *in vitro*, assim como foi visualizado nas espécies de *Vriesea* deste trabalho, quando cultivadas em casa de vegetação.

Proença e Sajo (2007) encontraram que somente a espécie de *Vriesea* da sub-família Tillandsioideae apresentou fibras extravasculares na face adaxial do mesófilo, próximo à epiderme. Esse fato também foi verificado por Arruda e Costa (2003). Nas folhas de espécies de *Tillandsia* estas fibras não foram observadas. Já nas plantas da subfamília Bromelioideae, todas as espécies apresentam fibras extravasculares, com exceção de *Bromelia balansae*. Assim, os autores sugerem que grupos de fibras extravasculares aparentam estar ausentes em Pitcairnioideae e serem raros em Tillandsioideae, embora ocorram com frequência nas folhas das Bromelioideae. Em

nosso trabalho, grupos de fibras extravasculares foram encontrados somente nas espécies *V. paraibica* e *V. simplex* cultivadas em casa de vegetação.

Arruda e Costa (2003) observaram a diferenciação do parênquima clorofiliano em paliçádico e parênquima esponjoso com células estreladas. Em nenhuma das espécies de *Vriesea* analisadas no presente estudo, foi possível observar a presença de parênquima em paliçada. Arruda e Costa (2003) inferem que devido ao ambiente méxico ocupado por *V. longiscapa*, de hábito epífita, ou seja, em partes, mais baixas de troncos e raramente no dossel, o parênquima paliçádico não é tão diferenciado. Segundo eles, as plantas que apresentam parênquima paliçádico bem desenvolvido, são provenientes de ambientes com alta intensidade solar. Pode-se inferir então, que as características das espécies de *Vriesea* estudadas no presente trabalho são devido ao fato de estarem alocadas em casa de vegetação, no qual a intensidade luminosa é menor, como o descrito para *V. longiscapa*.

Os canais de ar se apresentam distribuídos no mesofilo das plantas cultivadas *ex vitro* e intercalados aos feixes vasculares. Resultados semelhantes foram encontrados para *Tillandsia* sp em trabalho de Scatena e Segecin (2005) e Gonzaga e Castro (2008) e para *Ananas comosus* em trabalho de Barboza et al. (2006). Segundo Barboza et al. (2006), em plantas terrestres os canais de ar parecem atuar como reguladores nas trocas gasosas entre a planta e o ambiente. Gonzaga e Castro (2008) afirmam que os canais de ar facilitam a aeração das células vizinhas, auxiliando o processo fotossintético. Mauseth (1988) afirma que os canais de aeração podem fornecer flexibilidade às folhas. Segundo Proença e Sajo (2007), as células braciiformes que atravessam os canais de ar podem ser de formatos variados nas diferentes espécies, como estreladas, alongadas ou isodiamétricas. No caso de espécies de *Vriesea*, elas apresentam-se alongadas.

Com relação à vascularização das folhas, *Ananas comosus* também possuem feixes vasculares colaterais fechados com fibras a eles associados (BATAGIN et al., 2009; BARBOZA et al., 2006), sendo que Batagin et al. (2009) verificaram que a concentração de fibras é aparentemente menor em plantas *in vitro*., como visualizado nas espécies de *Vriesea*. Arruda e Costa (2003) observaram em espécies de *Vriesea*, a presença de feixes colaterais circundados por dois tipos de bainha: a endoderme constituída de células parenquimáticas e o periciclo fibroso. Resultados semelhantes foram encontrados para as espécies de *Vriesea* do presente estudo.

Mayer et al. (2008) trabalhando com *Cymbidium* ‘Joy Polis’ verificou que o mesofilo das plantas matrizes cultivadas *ex vitro* possui células com conteúdo celular mais

denso pela maior quantidade de cloroplastos e compostos fenólicos, como foi verificado também nas folhas de *Vriesea*. Esses autores e Proença e Sajo (2007), assim como em nosso trabalho, também observaram a presença de idioblastos com ráfides no mesofilo de todas as plantas. Segundo Zindler-Frank et al. (2001), a presença de cristais de oxalato de cálcio formados nos diferentes órgãos de uma planta está diretamente relacionada à quantidade de cálcio disponível para a planta. A ocorrência desses cristais pode estar associada com o processo de eliminação do excesso de cálcio no citosol (KOSTMAN et al., 2001). Portanto, a presença de idioblastos com ráfides no mesofilo em maior quantidade em plantas *in vitro* pode estar relacionada ao meio de cultura M4, que possui altas quantidades de cálcio (480 mg L^{-1}) (ARANDA-PERES et al., 2009). Além de regular a quantidade de cálcio nas células vegetais, os cristais de oxalato de cálcio atuam na proteção contra herbivoria e promovem a desintoxicação por metais pesados e ácidos (FRANCESCHI; NAKATA, 2005).

Ao contrário do que foi visto para as espécies de *Vriesea* cultivadas *in vitro*, que possuem um mesofilo com menor organização, Mayer et al. (2008) não percebeu alterações significativas do mesofilo de plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivadas *in vitro* em relação àquelas cultivadas *ex vitro*. Segundo Hazarika (2006), o mesofilo pouco diferenciado e o frágil sistema vascular das folhas formadas *in vitro* tornam essas plantas altamente susceptíveis ao estresse durante a aclimatização. As diferenças encontradas no mesofilo das plantas cultivadas *in vitro* podem ser devido a alterações morfo-anatômicas e fisiológicas nas plantas em decorrência de processos osmóticos, da presença de reguladores de crescimento vegetais no meio de cultura, trocas gasosas restritas, condições assépticas, baixa intensidade luminosa e alta concentração de açúcar (HAZARIKA, 2006).

Com base nos resultados aqui apresentados e em trabalhos prévios realizados com diversas espécies de Bromeliaceae das três subfamílias (TOMLINSON, 1969; BRIGHIGNA et al., 1984; ARRUDA; COSTA, 2003; AYOAMA; SAJO, 2003; SCATENA; SEGECIN, 2005, BARBOZA et al., 2006; PROENÇA; SAJO 2007; MONTEIRO, 2009; SILVA, 2009) encontradas em ambientes variados, com diferentes hábitos, pode-se dizer que a família Bromeliaceae apresenta folhas com características xeromórficas e as plantas estão adaptadas a viverem em ambientes sujeitos a estresse hídrico: epiderme recoberta com escamas absortivas, hipoderme bem definida, presença de ráfides com cristais de oxalato de cálcio, canais de aeração bem desenvolvidos, câmaras subestomáticas proeminentes, parênquima aquífero, parênquima clorofiliano bráquiforme,

presença de fibras vasculares e extravasculares e folhas, geralmente, hipostomáticas. Além disso, as plantas apresentam plasticidade fenotípica a fim de se adaptarem às características do ambiente no qual se encontram.

5.6. Introdução *in vitro* das espécies a partir de ápices caulinares

Os ensaios preliminares de assepsia mostraram não haver diferença na introdução em meio líquido ou sólido. Também a pré-imersão em solução de cefotaxima (100 mg L^{-1}) nos tratamentos 1 a 6 não surtiu efeito, bem como a utilização do sonificador, ou de óleo fúsel (Tabela 3). Desta forma, optamos pela utilização de meio sólido, aumentando a concentração de cefotaxima no meio de introdução (de 250 mg L^{-1} ou 500 mg L^{-1} para 600 mg L^{-1}), sem a imersão em solução de antibiótico previamente à introdução *in vitro*. A assepsia em hipoclorito de sódio a 50% foi escolhida visando à obtenção de um bom controle na contaminação associado a uma condição aceitável de oxidação dos explantes.

Foram introduzidos *in vitro* 16 ápices caulinares de *V. carinata*, 10 de *V. paraibica*, 15 de *V. philipo-coburgii*, 16 de *V. simplex* e 10 de *A. nudicaulis*. Dez dias após a introdução, foram observados explantes contaminados, oxidados e, em menor porcentagem, explantes sadios (Figuras 27 e 28). Elevada porcentagem de contaminação fúngica foi observada, totalizando: 75 % em *V. carinata*, 70 % em *V. paraibica*, 40 % em *V. philipo-coburgii*, 50 % em *V. simplex* e 30 % em *A. nudicaulis*. *V. carinata* não apresentou contaminação bacteriana, sendo que esta variou entre 12,5 % e 30 % para as demais espécies (Figura 28). Para *V. paraibica* 100% dos explantes apresentaram contaminação fúngica ou bacteriana.

Oxidação seguida de necrose do explante foi mais acentuada para *V. simplex* (37,50 %) e menos evidente nas espécies *V. carinata* (6,25 %) e *V. philipo-coburgii* (6,67 %). *A. nudicaulis* não apresentou oxidação nos explantes, não sendo possível avaliar para *V. paraibica* visto que 100 % dos explantes foram contaminados. Aos dez dias *V. carinata*, *V. philipo-coburgii* e *A. nudicaulis* apresentaram 18,75 %, 33,33 % e 40 %, respectivamente, de explantes sadios (Figura 28).

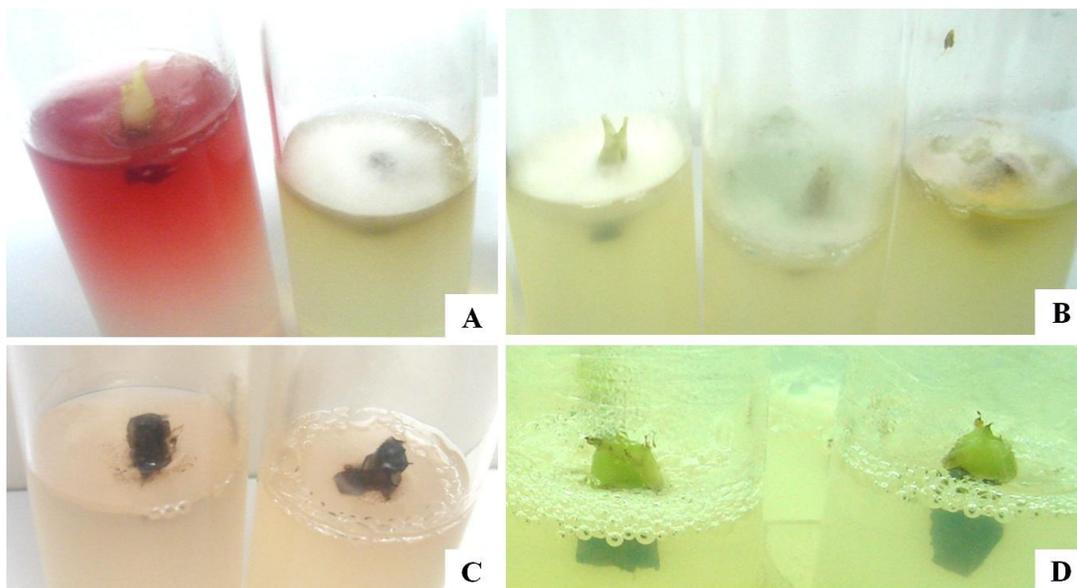


Figura 27 - Exemplos das características observadas nas culturas de ápices caulinares *in vitro* de *Aechmea nudicaulis* e *Vriesea* spp., quinze dias após a introdução *in vitro*: (A) contaminação bacteriana e fúngica, (B) contaminação fúngica, (C) ápices oxidados e necrosados e (D) ápices saudios

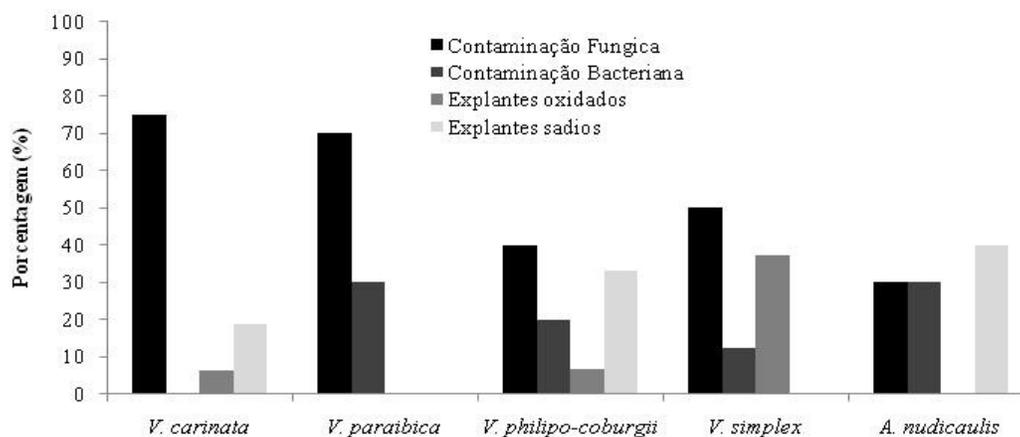


Figura 28 - Avaliação das culturas de ápices caulinares de quatro espécies de *Vriesea* (*V. carinata*, *V. paraibica*, *V. philipo-coburgii*, *V. simplex*) e de *A. nudicaulis*, 10 dias após a introdução *in vitro*, quanto à contaminação, oxidação e sobrevivência

Entre dez e trinta dias após a introdução dos explantes *in vitro*, não se observou mais evidências de contaminações, porém, aos trinta dias um maior número de explantes apresentou oxidação, seguida de necrose dos tecidos. Entre os ápices saudios existentes aos 10 dias, 100 % em *V. carinata*, 60 % em *V. philipo-coburgii*, e 25 % em *A. nudicaulis*

foram perdidos por oxidação. Assim, do total de ápices introduzidos restaram apenas dois explantes de *V. philipo-coburgii* e três de *A. nudicaulis*.

Após transferência para meio de multiplicação, observou-se significativa diferença no comportamento dos explantes de *V. philipo-coburgii* e *A. nudicaulis*, em relação ao número de gemas e brotos à velocidade de desenvolvimento dos mesmos (Figura 29).

Comparando-se o desenvolvimento de brotos, a espécie de *Vriesea* é visivelmente mais lenta e menos proliferativa do que a *A. nudicaulis*. Esta última, no mesmo período avaliado, 10 meses após a introdução *in vitro*, já apresentava brotos evidentes, bem formados e já separados do explante, enquanto a *Vriesea* aparentava ter apenas um início de regeneração (Figura 29). Aos 14 meses após o estabelecimento *in vitro* dos ápices, um dos explantes de *V. philipo-coburgii* regenerou uma planta e outro explante da mesma espécie apresentou brotações que regeneraram aproximadamente 25 plântulas. Já os três explantes de *Aechmea nudicaulis* apresentaram brotações que regeneraram aproximadamente 200, 130 e 175 plantas por explante. As plantas encontravam-se muito pequenas para serem individualizadas.



Figura 29 - Comparação entre a eficiência de regeneração a partir de ápices caulinares de espécie de *Vriesea philipo-coburgii* e *Aechmea nudicaulis* após 4, 10 e 14 meses da introdução *in vitro*. Cada figura corresponde a brotos provenientes de um único explante. *V. philipo-coburgii* 4 meses após a introdução (A); *V. philipo-coburgii* 10 e 14 meses após a introdução, explante 1 (B e C, respectivamente); *V. philipo-coburgii* 10 e 14 meses após a introdução, explante 2 (D e E, respectivamente). *A. nudicaulis* 4 meses após a introdução (F), *A. nudicaulis* 10 meses após a introdução (G, H e I, explantes 1, 2 e 3 respectivamente) e *A. nudicaulis* 14 meses após a introdução (J)

Com base nos dados aqui relatados, podemos afirmar que o processo de assepsia utilizado foi eficiente para controlar a contaminação bacteriana, já que o máximo de contaminação por este tipo de microrganismos foi de 30%. Carneiro et al. (2000), em estudos de descontaminação de explantes de bananeira, obtiveram resultados semelhantes. O tratamento com 300 mg L⁻¹ de cefotaxima foi o que apresentou maior eficiência, com 73,33% dos explantes não contaminados, quando comparado com NaOCl, rifampicina e benomyl. Rodrigues (2005) testou os antimicrobianos cloranfenicol, cefotaxima e a associação cloranfenicol e cefotaxima em doses 50, 150, 250 e 500 mg L⁻¹ em meio MS, como forma de controle das bactérias endofíticas encontradas em *Heliconia rauliniana* e constatou que cefotaxima aplicada isoladamente, na dose de 500 mg L⁻¹, foi a forma mais eficiente de controle de contaminação bacteriana para esta espécie de helicônia.

No presente estudo, como ocorreram explantes normais e sadios ao final do período estudado, pode-se dizer que o antibiótico e sua concentração utilizados na assepsia (cefotaxima a 600 mg L⁻¹) não apresentou ação fitotóxica importante.

Com relação à contaminação fúngica, pode-se afirmar que esta foi altamente prejudicial ao desenvolvimento e regeneração dos ápices caulinares introduzidos. Carneiro et al. (2000) também encontraram maiores taxas de contaminações fúngicas quando comparadas às bacterianas. Para um teste futuro, poder-se-ia aplicar também um fungicida ao meio de cultura ou no processo de assepsia na forma de banho, conforme recomendam Grattapaglia e Machado (1998).

Uma boa opção para o controle dos contaminantes após a introdução do explante *in vitro* é o tratamento prévio das plantas matrizes que virão a fornecer os explantes, com a aplicação de bactericidas e/ou fungicidas sistêmicos, mediante cronograma rígido, passíveis de reduzirem a quantidade de microrganismos nas plantas matrizes (FRANCLET; BOULAY, 1982), principalmente dos endofíticos. Esse procedimento pode se mostrar muito importante na família Bromeliaceae, principalmente nas espécies utilizadas neste trabalho. Estas são bromélias que possuem uma adaptação ao ambiente epífita composta de folhas sobrepostas que formam um reservatório de água e nutrientes, chamado de tanque. Essa habilidade de reter água e nutrientes cria um habitat que é explorado por vários animais como anfíbios e aranhas e por microrganismos simbióticos, que fixam nitrogênio para as plantas, ou microrganismos ocasionais que colonizam o tanque (BRIGHIGNA et al., 1992). Assim, esse tipo de bromélia pode ter vários

microrganismos habitando o seu tanque, sendo que um tratamento prévio destas plantas matrizes pode reduzir esse número e evitar que com um processo de assepsia ineficaz ou com a manipulação da planta, esses microrganismos acabem caindo no meio de cultura, contaminando-o.

Se a planta matriz estiver em casa de vegetação, a probabilidade de colonização por microrganismos pode ser diminuída se as plantas forem regadas diretamente no substrato não permitindo o acúmulo de água no tanque.

Koh e Davies Junior (1997) verificaram que explantes foliares obtidos de plantas matrizes de *Cryptanthus bkittutus* (Bromeliaceae) tratadas semanalmente com 25ppm de Agribom tiveram taxas de contaminação muito menores (17-21%) do que aquelas que não foram tratadas (27-75%). No presente trabalho, as plantas matrizes foram tratadas com Agrimicina a 1% pulverizado nas folhas e no substrato. Em experimentos futuros podem ser testadas concentrações mais fortes, já que as plantas não apresentaram nenhum sintoma de fitotoxicidade na concentração utilizada, e também outros produtos mais específicos.

Para um controle mais eficaz dos microrganismos contaminantes na cultura de tecidos, é indicado, através de ferramentas moleculares, análises de morfologia entre outros, para tentar identificá-los, principalmente se os microrganismos encontrados forem endofíticos ou referentes ao local no qual a planta se encontra, apresentando-se dessa forma, recorrentes quando os explantes são introduzidos *in vitro*. Dessa forma, pode-se utilizar os antibióticos e/ou fungicidas específicos para aquele grupo de microrganismos. Pereira et al, 2003), através de ferramentas bioquímicas, conseguiram identificar e isolar oito estirpes de bactérias pertencentes à família Acetobacteriaceae e Enterobacteriaceae em batata (*Solanum tuberosum*), cultivadas *in vitro*. A identificação dos microrganismos é um aspecto importante na cultura de tecidos quando o alto custo do antibiótico e sua eventual toxicidade para o explante são levados em conta, de modo que esta caracterização dos microrganismos permite a escolha de um antibiótico específico para o controle dos mesmos.

Outro problema verificado neste experimento foram as altas taxas de oxidação resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro* precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado (VAN WINKLE, JOHNSON; PULLMAN, 2003). Os ápices oxidados tornaram-se escuros e depois necrosaram. Segundo Azofeifa (2009) algumas estratégias podem ser utilizadas visando a diminuição deste problema: crescimento do

explante em baixas temperaturas afim de diminuir seu metabolismo, uso de adsorventes no meio de cultura como o carvão ativado, utilização de substâncias antioxidantes no meio ou como banho após o processo de assepsia como o PVPP (polyvinylpolypyrrolidone), ácido ascórbico ou ácido cítrico, ajustar o pH do meio para valores mais baixos, não utilizar reguladores de crescimento vegetais no início do processo e utilizar meios mais diluídos principalmente nos elementos cobre e ferro que estão envolvidos com a atividade das enzimas oxidativas.

Os problemas encontrados, conforme citado acima, tiveram graus distintos entre as espécies. Isso pode ser explicado pelo fato de que as plantas matrizes vieram de diferentes lugares e produtores do Brasil, o que, por consequência, acarreta na submissão destas a diferentes manejos, seja na irrigação, no estado nutricional, ou no tratamento de possíveis doenças, entre outros.

Foi observado também, na presente pesquisa, que a escolha do ápice caulinar como explante inicial da cultura *in vitro* das espécies em questão é uma boa opção, visto que aqueles que contaminaram ou necrosaram, apresentaram brotações e posterior regeneração de plantas. Se os problemas citados de contaminação e oxidação forem contornados, esta se torna uma opção de explante válida, pois as perdas seriam menores e as taxas de multiplicação seriam elevadas. Ainda assim, podem ser estudadas outras opções de explantes como explantes foliares, como no estudo de Alves et al. (2006) com *Vriesea reitzii* e Mercier e Kerbauy (1995) com *V. fosteriana*, ou gemas da hastefloral (DAQUINTA;ALMEIDA; GUERRA,1998). Outra opção com tecidos somáticos seria a utilização das gemas axilares, como nos estudos de Barboza et al. (2004).

Com relação à capacidade de regeneração e posterior multiplicação de *V. phillip-coburgii* em comparação com a de *Aechmea nudicaulis*, ficou evidente que esta última apresenta maior potencial morfogênético e propagativo quando comparada à espécie de *Vriesea*. Não foi possível a comparação com as demais espécies de *Vriesea*, já que os explantes das mesmas foram perdidos pelos problemas supracitados. Benzing (1990) atribuiu o desenvolvimento lento de espécies de bromélias epífitas à sua capacidade limitada de aumentar seu crescimento em resposta aos incrementos de nutrientes e umidade fornecidos. O desenvolvimento lento é uma adaptação das plantas epífitas à sobrevivência em ambientes oligotróficos, representando uma economia significativa na utilização dos recursos na síntese de material vegetal. Esse crescimento lento foi também verificado para *V. gigantea* no trabalho de Pereira et al. (2009). Aranda-Peres (2005)

também observou que as espécies de *Vriesea* apresentam crescimento lento quando em comparação com outras bromélias.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as sementes têm a capacidade de germinar dentro de uma determinada faixa de temperatura, característica para cada espécie sendo essa faixa determinada pela adaptação da plântula/semente ao microclima, dentro do habitat, onde ela se encontra. Essa adaptabilidade é reproduzida *in vitro*. Observou-se que a germinação *ex vitro* foi bem menos eficiente do que quando este processo se dá sob condições *in vitro*, visto que as espécies apresentaram taxas de germinação menores e de mortalidade maiores em casa de vegetação. Além disso, sob condições *in vitro*, a temperatura de 32 °C mostrou-se prejudicial às espécies, indicando que as espécies de *Vrieseas*, bem como outras epífitas, poderão ser uma das primeiras a sentirem as mudanças climáticas.

A descrição morfo-anatômica do desenvolvimento pós-seminal permitiu a caracterização de cinco estágios de desenvolvimento: semente, emissão da base cotiledonar e da raiz primária rudimentar, emissão do primeiro eófilo, emissão do segundo eófilo e planta jovem.

Com base nos resultados apresentados para o experimento de ajuste mineral do meio de cultura para as espécies de *Vriesea* estudadas, podemos concluir que a combinação das doses de N e Mg testadas acarretou em uma redução acentuada nos teores foliares de Ca e K, interferindo no potencial osmótico das células, acarretando em menor acúmulo de massa fresca.

Com base na análise morfoanatômica das folhas das espécies em estudo cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, pode-se afirmar que nas quatro espécies sob estudo foram encontradas estruturas típicas de bromeliáceas: tricomas escamiformes, estômatos presentes apenas na superfície abaxial, epiderme unisseriada, mesofilo constituído de parênquima aquífero, feixes vasculares colaterais fechados e canais de aeração. O mesofilo é muito mais definido e diferenciado nas plantas cultivadas na casa de vegetação do que nas micropropagadas. As quatro espécies possuem escamas e estômatos com morfologia similar, não sendo possível a distinção entre espécies com base nessas estruturas. É nítido que as plantas passam por uma adaptação, durante a aclimatização, ao ambiente externo, sofrendo alterações estruturais em decorrência das diferentes condições às quais estão sendo expostas.

A introdução *in vitro* a partir de explantes somáticos é frequentemente uma limitação para o cultivo *in vitro* de bromélias. Na assepsia, o uso de cefotaxima apresenta

uma boa eficiência no combate à contaminação bacteriana em cultura de ápices caulinares de espécies de *Vriesea* sendo que a contaminação fúngica apresentou-se como o maior problema para estabelecimento *in vitro* dos cultivos. A escolha do ápice caulinar de brotos laterais como explantes iniciais para a cultura das referidas espécies *in vitro* é uma boa opção, pois os explantes que permaneceram viáveis apresentaram boas taxas de regeneração. Nas espécies do gênero *Vriesea*, o tempo para início da multiplicação e as taxas de regeneração são muito mais lentas em comparação com *A. nudicaulis*.

O fato de que muitas espécies de *Vriesea*, endêmicas da Mata Atlântica brasileira, estarem sofrendo um grande declínio populacional, estando algumas listadas como ameaçadas ou em perigo de extinção aumenta a importância de que esforços sejam feitos no sentido de otimizar a propagação das mesmas de modo a diminuir a pressão extrativista que estas vêm sofrendo atualmente e, ao mesmo tempo, abastecer o mercado ornamental.

A germinação eficiente de sementes e a obtenção de plântulas que podem servir como explantes de partida podem subsidiar trabalhos de conservação *in vitro*, assim como de resgate de variedades ameaçadas de extinção.

REFERÊNCIAS

- ACEVES-TOLEDO, T.; WOLF, J. H. D. Germination and Establishment of *Tillandsia eizii* (Bromeliaceae) in the Canopy of an Oak Forest in Chiapas, Mexico. **Biotropica**, Washington, DC, v. 40, n. 2, p. 246–250, 2008.
- ADAMS, W. W.; CRAIG, M. E. Physiological consequences of changes in life form of the Mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae). **Oecologia**, Berlin, v. 70, p. 298–304, 1986.
- ALI, I.-E. A.; KAFKAFI, U.; YAMAGUCHI, I.; SUGIMOTO, Y.; INANAGA, S. Growth, transpiration, root-borne cytokinins and gibberellins, and nutrients compositional changes in sesame exposed to low root-zone temperature under different ratios of nitrate:ammonium supply. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 23, p. 123–140, 2000.
- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 55-60, 1993.
- ALVES, F. M.; TEIXEIRA, N. T. Óleo fúsel no desenvolvimento de mudas de plantas nativas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 331-334, 2009.
- ALVES, G. M.; GUERRA, M. P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 51, n. 5, p. 202-212, 2001.
- ALVES, G. M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, p. 204-207, 2006.
- AMARAL, T. L.; JASMIM, J. M.; NAHOUM, P. I.; FREITAS, C. B.; SALES, C. S. Adubação nitrogenada e potássica de bromeliáceas cultivadas em fibra de coco e esterco bovino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 286-289, 2009.
- AMENDOEIRA, F. C.; FRUTUOSO, V. S.; CHEDIER, L. M.; PEARMAN, A. T.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C.; PRESCOTT, S. M.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. 2005a. Anti-nociceptive effect of *Nidularium procerum*: A Bromeliaceae from Brazilian coastal rain forest. **Phytomedicine**, Jena, v. 12, p. 78-87, 2005.
- AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, p. 565-568, 2002.
- ANACLETO, A. **Germinação de sementes e desenvolvimento de brotos de *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb (Bromeliaceae): subsídios à produção e extrativismo sustentável**. 2005. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ANACLETO, A.; ANACLETO, A. F. M.; BASSO, L. Gestão ambiental, o desafio do uso sustentável dos recursos florestais. **Argumento. Revista das Faculdades Anchieta**, Jundiá, v. 1, n. 2, p. 1-18, 2006.

ANDRADE, A. C. S. Efeito da luz e da temperatura na germinação de *Leandra breviflora* Cong., *Tibouchina benthamiana* Cong., *Tibouchina grandifolia* Cong. e *Tibouchina moricandia* (DC.) Baill. (Melastomataceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 17, p. 29-35, 1995.

ANDRADE, A. C. S.; CUNHA, R.; SOUZA, A. F.; REIS, R. B.; ALMEIDA, K. J. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 31, p. 125-137, 2003.

AOYAMA, E. M.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de *Aechmea* Ruiz & Pav. subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, p. 461-473, 2003.

ARANDA-PERES, A. N. **Cultivo *in vitro* de bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, avaliação nutricional e substratos para aclimação.** 2005. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear da Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. Bromeliads. In: SILVA, J. A. T. da (Org.). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology.** Tokyo: Global Science Books, 2006. v. 4, p. 644-655.

ARANDA-PERES, A. N.; MARTINELLI, A. P.; PERES, L. E. P.; HIGASHI, E. N. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: The importance of calcium. **HortScience**, St. Joseph, v. 44, n. 1, p. 106-112, 2009.

ARIAS, O. Commercial micropropagation of banana. In: BIOTECHNOLOGY applications for banana and plantain improvement. San Jose, Costa Rica: Inibap, 1992. p. 139-142.

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 11, p. 1081-1089, 2002.

ARRUDA, R. C. O.; COSTA, A. F. Foliar anatomy of five *Vriesea* Sect. *Xiphion* (Bromeliaceae) species. **Selbyana**, Sarasoza, v. 24, p. 180-189, 2003.

AZOFEIFA, A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. **Agronomía Mesoamericana**, Costa Rica, AC, v. 20, n. 1, p. 153-175, 2009.

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; LANI, E. R. G. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 773-781, 2007.

- BARACHO, G. S. Vegetative propagation in the bromeliaceae. **Bromélia**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 23-27, 1997.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 8, p. 725-733, 2004.
- BARBOZA, S. B. S. C. B.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 185-194, 2006.
- BATAGIN, K. D.; ALMEIDA, C. V.; TANAKA, F. A. O.; ALMEIDA, M. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiros cv. IAC “Gomo-de-mel” micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 1, p. 85-92, 2009.
- BELTRATI, C. M. **Morfologia e anatomia de sementes**. Rio Claro: Departamento de Botânica da UNESP, 1994. 108 p. (Apostila).
- BENCKE, M.; DROSTE, A. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich. (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas Botânica**, São Leopoldo, n. 59, p. 299-306, 2008.
- BENNETT, B. C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZING, D. H.(Ed.). **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 587-608.
- BENZING, D. H. Bromeliad trichomes: structure, function, and ecological significance. **Selbyana**, Sarasota, FLA, v. 1, p. 330-348, 1976.
- BENZING, D. H. Germination and early establishment of *Tillandsia circinnata* Schlecht. (Bromeliaceae) on some of its hosts and other supports in southern Florida. **Selbyana**, Sarasota, v. 5, p. 95-106, 1978.
- BENZING, D.H. **Vascular epiphytes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- BENZING, D. H. Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 39, p. 519-540, 1998.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile and adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 690 p.
- BENZING, D. H.; BURT, K. M. Foliar permeability among twenty species of the Bromeliaceae. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 97, p. 269-279, 1970.
- BENZING, D. H.; RENFROW, A. The nutritional dynamics of *Tillandsia circinnata* in southern Florida and the origin of the “air plant” strategy. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 141, n. 2, p. 165-172, 1980.

- BITTENCOURT, A. H. C. **Anatomia foliar de espécies do gênero Vriesea Lindl (Bromeliaceae) no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG.** 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.
- BLACK, R. J.; DEHGAN, B. **Bromeliads.** CIR1090. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, 2003. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/edfiles/MG/MG27200.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2011.
- BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 209-222.
- BORGHETTI, F. Temperaturas extremas e a germinação de sementes. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Ed.). **Estresses ambientais, danos e benefícios em plantas.** Recife, PE: MXM Gráfica e Editora, 2005. p. 207-218.
- BRAGA, M. F.; SÁ M. E. L. de; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.
- BRAVATO, M. Estudio morfológico de frutos y semillas de las Mimosoideae (Leguminosae) de Venezuela. **Acta Botanica Venezuelica**, Caracas, v. 9, n. 1/4, p. 317-361, 1974.
- BRIGHIGNA, L.; MONTAINI, P.; FAVILLI, F.; TREJO, A. C. Role of the nitrogen-fixing bacterial microflora in the epiphytism of *Tillandsia* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 79, n. 7, p. 723-727, 1992.
- BROMELIADS SOCIETY OF QUEENSLAND (Inc). **Starting with bromeliads.** Fortitude Valley, Australia, 2006.
- BUBA'N, T.; VARGA, A.; TROMP, J.; KNEGT, E.; BRUINMA, J. Effects of ammonium and nitrate nutrition on the levels of zeatin and no nitrogen in xylem sap of apple rootstocks. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Jena, v. 89, p. 289-295, 1978.
- CADAHIA, C. **Fertirrigación: Cultivos hortícolas y ornamentales.** Madrid: Mundi-Prensa, 1998.
- CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimação de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 25, p. 2-12, 1996.
- CÂNDIDO, M. S. D. Chave artificial para o gênero *Cryptanthus*. **Bromélia**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 15-21, 1995.

- CARNEIRO, L. A.; CÂNDIDO, M. S. D.; ARAÚJO, R. F. G.; FONSECA, M. H. P. B.; CROCOMO, O. J.; MANSUR, E. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosos* L. B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae specie from Rio de Janeiro, Brazil. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, Dhaka, Bangladesh, v. 4, p. 153-158, 1998.
- CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G. J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA A.; CROCOMO, O. J. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, p. 79-83, 1999.
- CARNEIRO, M. F.; SILVA, G. D.; XIMENES, P. A.; CARNEIRO, I. F.; BORGES, J. D. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 1, p. 29-35, 2000.
- CARVALHO, L. F. N. **O cultivo da bromélia**. São Paulo, SP: Editora TJV, 2002. 32 p.
- CHEN, W. S.; LIU, H. Y.; LIU, Z. H.; YANG, L.; CHEN, W. H. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 90, p. 391-395, 1994.
- CLINE, M. G. The role of in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 90, p. 230-237, 1994.
- CLOYD, R. A.; DICKINSON, A. Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and neonicotinoid insecticides on the fungus gnat *Bradysia* sp nr. *Coprophila* (Lintner) (Diptera: Sciaridae). **Pest Management Science**, London, v. 62, p.171–177, 2006.
- COFFANI NUNES, J. V. **Bromélias**. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais. São Paulo: SENAC, 2002. p. 119-132.
- COSTA, A. F. **Revisão taxonômica do complexo *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae)**. 2002. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- COSTA, A.F.; RODRIGUES, P. J. F. P.; WANDERLEY, M. G. Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 159, p. 163–181, 2009.
- COUSSON, A.; TRAN THANH VAN, K. Influence of ionic composition of the culture medium on de novo flower formation in tobacco thin cell layers. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, p. 506–511, 1993.
- COXSON, D. S.; NADKARNI, N. M. **Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest ecosystems**. New York: Academic Press, 1995. p. 495-543.
- COZZA, R.; TURCO, D.; BATI, C. B.; BITONTI, M. B. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p. 215-223, 1997.

- CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 101, n. 10, p. 3703-3708, 2004.
- CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S. **O abacaxizeiro**. Cultivo, agroindústria e economia. 1. ed. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 1999.
- DAL VESCO, L. L.; PINTO, A. A.; ZAFFARI, G. R.; NODARI, R. O.; REIS, M. S.; GUERRA, M. P. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits**, Paris, v. 56, p. 143-154, 2001.
- DAQUINTA, M.; ALMEIDA, A. P.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis of immature flower and buds of flower stalk in *Dyckia distachya*. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 49, n. 2, p. 72-76, 1998.
- DE PAULA, C. C. **Cultivo de bromélias**. Viçosa: Editora Aprende Fácil, 2000.
- DEBERGH, P. C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 59, p. 270-276, 1983.
- DEY, R.; PAL, K. K.; BHATT, D. M.; CHAUHAN, S. M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growthpromoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 159, p. 371-394, 2004.
- DINIZ, J. D. N. **Crescimento e absorção mineral em explantes de bananeira (*Musa sp.* AAB), cv. Prata Anã, *in vitro***. 1996. 96 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.
- DINIZ, J. D. N.; GONÇALVES, A. N.; HERNANDEZ, F. F. F.; TORRES, A. C. Absorção de macronutrientes explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1201-1209, 1999.
- DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELO, L. A. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.
- DOWNS, R. J. Photocontrol of germination of seeds of the Bromeliaceae. **Phyton**, Buenos Aires, v. 21, p. 1-6, 1963.
- DROSTE, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. *In Vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.
- DUARTE, E. F.; CARNEIRO, I. F.; SILVA, N. F.; GUIMARÃES, N. N. R. Características físicas e germinação de sementes de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh

(Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, p. 422-429, 2010.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 33, p. 157–162, 1993.

ÉDER-SILVA, E.; NASCIMENTO, L. C.; FELIX, L. P.; BRUNO, R. L. A.; SOUTO, F. M.; VIEIRA, R. M. Avaliação da influência de microorganismos sobre a germinação de sementes de jaracatiá incubadas sob diferentes temperaturas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8., 2004, João Pessoa, Paraíba. **Anais...** João Pessoa, Paraíba, 2004. p. 227.

EHRENDORFER, F. Adaptive significance of major taxonomic characters and morphological trends in angiosperms. In: HEYWOOD, V. H. (Ed.). **Taxonomy and ecology**. London: Academic Press, 1973. p. 317-327.

ENDRES, L.; MERCIER, H. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 1, p. 29–42, 2001.

ENDRES, L.; MERCIER, H. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated in vitro. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 181–187, 2003.

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

EPENHUIJSEN, C. W.; PAGE, B. B. C.; KOOLAARD, J.P. Preventative treatments for control of fungus gnats and shore flies. **New Zealand Plant Protection**, Christchurch, New Zealand, v. 54, p. 42-46, 2001.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2005. 380 p.

EVANS, N. E. A preliminary study on the effects of nitrogen supply on the growth *in vitro* of nine potato genotypes (*Solanum* spp.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 261, p. 837-841, 1993.

FAUTH, A.; TOFOL, M.; SILVA, A. L.; MARASCHIN, M. **Aclimação de mudas de abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merrill] resistentes à fusariose, cultivadas *in vitro***. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 2, p. 7-12, 1994.

FISCHER, E. A.; ARAÚJO, A. C. Spatial organization of a bromeliad community in the Atlantic rainforest, southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 11, p. 559-567, 1995.

- FONTES, P. C. R.; LOURES, J. L.; GALVÃO, J. C.; CARDOSO, A. A.; MANTOVANI, E. C. Produção e qualidade do tomate produzido em substrato, no campo e em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 614-619, 2004.
- FORZZA, R. C. **Filogenia da tribo Puyeeae Wittm. e revisão taxonômica do gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae)**. 2001. 208 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- FOSTER, P. The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. **Earth Science Reviews**, Amsterdam, v. 55, p. 73–106, 2001.
- FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 41-71, 2005.
- FRANCIET, A.; BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant *Eucalyptus* clones. **Australian Forest Research**, Canberra, v. 13, p. 83-89, 1982.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. 2010. **SOS Mata Atlântica**. Disponível em: <http://www.sosma.org.br>. Acesso em: 12 jan. 2010.
- GAFF, D. F. Desiccation tolerant plants in South America. **Oecologia**, Berlin, v. 74, p. 133-136, 1987.
- GARWOOD, N. C. Functional morphology of tropical tree seedling. In: SWAINE, M. D. (Ed.). **The ecology of tropical forest tree seedlings**. Paris: UNESCO, 1996. p. 59-129.
- GERALD, L. T. S. **Biofábrica: produção industrial de plantas in vitro**. Araras: UFSCAR, 1995. 107 p.
- GILLESPIE, D. R.; MENZIES, J. G. Fungus gnats vector *Fusarium oxysporum* f. sp *radicislycopersici*. **Annals of Applied Biology**, v. 123, p. 539–544, 1993.
- GIVINISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; KENNETH, J. S. Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography os Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso**, Claremont, v. 23, p. 3-26, 2007.
- GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, New York, v. 98, n. 5, p. 1-24, 2011.
- GOMES, D. M. S. **Anatomia foliar de *Gomidesia spectabilis* (DC) Berg e *G. nitida* (Vell) Legr. (Myrtaceae)**. 1992. 102 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992.
- GOMES, M. A. N.; SHEPHERD, S. L. K. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às

condições de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 153-159, 2000.

GONÇALVES, S.; CORREIA, P. J.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A.; ROMANO, A. A new formulation for in vitro rooting of carob tree base don leaf macronutrients concentrations. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 49, p. 277-280, 2005.

GONZAGA, H. T.; CASTRO, N. M. Anatomia foliar de espécies de Bromeliaceae das matas ciliares do Rio Araguari (Triângulo Mineiro). In: ENCONTRO INTERNO, 8.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2008, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008. Disponível em: <http://www.ic-ufu.org/anaisufu2008/PDF/IC2008-0482.PDF>. Acesso em: 05 maio 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRIBBLE, K.; CONROY, J. P.; HOLFORD, P.; MIHAN, J. P. *In vitro* uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 50, p. 713-723, 2002.

GROSSI, F. **Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia**. 2000. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

GROTZ, N.; GUERINOT, M. L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1763, p. 595–608, 2006.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. 1. Cultura de tecido vegetal. Florianópolis: CCA/UFSC, 2006. 41 p.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the micropropagation of bromeliads. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. (Ed.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. cap. 6. (Methods in Molecular Biology, 589).

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, 1999.

GUNN, C. R. Seed collecting and identification. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v. 3, p. 55-143.

HALDEMAN, J. H.; THOMAS, R. L.; MCKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **HortScience**, St. Joseph, v. 22, p. 306-307, 1987.

HARPER, J. L. **Population biology of plants**. New York: Academic Press, 1977.

HARRIS, M. A.; OETTING, R. D.; GARDNER, W. A. Use of entomopathogenic nematodes and a new monitoring technique for control of fungus gnats, *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae), in floriculture. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 412-418, 1995.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 105-120, 2006.

HEPLER, P. K. Calcium: a central regulator of plant growth and development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 2142-2155, 2005.

HIETZ, P.; HIETZ-SEIFERT, U. Structure and ecology of epiphyte communities of a cloud forest in central Veracruz, Mexico. **Journal of Vegetation Science**, Uppsala, v. 6, p. 719-728, 1995.

HIGASHI, E. N. **Diagnose de deficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus* spp. cultivados *in vitro***. 1996. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience**, St. Joseph, v. 15, p. 603-604, 1980.

HOWE, H. F.; SMALLWOOD, J. Ecology of seed dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 13, p. 201-228, 1982.

INOUE, M. T.; GRAÇA, M. E. C.; CORREA, G. Capacidade fotossintética de plântula micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 36, p. 71-77, 1998.

JAKOBSON, A.; ERIKSSON, O. A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. **Oikos**, Kobenhavn, v. 88, p. 494-502, 2000.

JONES, J. B.; MURASHIGE, T. Tissue culture propagation of *Aechmea fasciata* and other bromeliads. **Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Carlisle, PA, v. 24, p. 117-126, 1974.

KÄMPF, A. N. Substratos hortícolas: turfa e casca de arroz. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 46, n. 409, p. 12-13, 1993.

KÄMPF, A. N. Adubação foliar em *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 16-20, 1994.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. SMITH *in vitro***. 2005. 187 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇALVES, A. N.; DEMÉTRIO, V. A.; JOCYS, T.; TAVARESSA, A. R. Effect of calcium on the *in vitro* growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker). **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 32, p. 867–877, 2009.

KENNEDY, M. K. Survival and development of *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae) on fungal and nonfungal food sources. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 67, p. 745-749, 1984.

KERBAUY, G. B. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Jena, v. 113, p.287-291, 1984.

KNUDSON C, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, Washington, DC, v. 14, p. 214-217, 1946.

KOH, Y. C.; DAVIES JUNIOR, F. T. Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 70, p. 301-307, 1997.

KOSTMAN, T. A.; TARLYN, N. M.; LOEWUS, F. A.; FRANCESCHI, V. R. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 634-640, 2001.

LACERDA, F. C. B.; LEMOS, O. F. Efeito de agentes desinfetantes e antioxidantes no estabelecimento de ápices caulinares *in vitro* de cultivares de bananeira. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA, 6.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL (AVALIAÇÃO - 2008), 12., 2008, Belém, PA. **A importância da iniciação científica para a pós-graduação: anais...**

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531 p.

LEGGATT, I. V.; WAITES, W. M.; LEIFERT, C.; NICHOLAS, J. Characterization of micro organisms isolated from plants during micropropagation. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 225, p. 93-102, 1988.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 2, p. 83-109, 1995.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S. M.; WAITES, B.; CHEYNE, V. A.; WAITES, W. M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis* *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

- LIMA FILHO, O. F.; MALAVOLTA, E. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 12, p. 53-61, 1997.
- LIN, C. Y.; YEH, D. M. Potassium nutrition affects leaf growth, anatomy, and macroelements of *Guzmania*. **Hortscience**, St. Joseph, v. 43, n. 1, p. 146–148, 2008.
- LUGO, A. E.; SCATENA, F. N. Epiphytes and climate change research in the Caribbean: a proposal. **Selbyana**, Sarasoza, v. 13, p. 123-130, 1992.
- MADISON, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbyana**, Sarasota, FLA, v. 2, p. 1-13, 1977.
- MAJEROWICZ, N. Fotossíntese. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 114-178.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 251 p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.
- MANTOVANI, A.; IGLESIAS, R. R. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 87, p. 73-84, 2005.
- MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 65, n. 2, p. 103-111, 1990.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. New York: Academic Press, 1995. 889 p.
- MARTINELLI, G. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: LIMA, H. C. de; GUEDES-BRUNI, R. R. (Ed.). **Serra de Macaé de Cima: diversidade florística e conservação em mata atlântica** Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1997. p. 213-250.
- MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.
- MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1988.
- MAYER, J. L. S.; RIBAS, L. L. F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort.(Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008.

MEAD, F. W.; FASULO, T. R. **Darkwinged fungus gnats, *Bradysia* spp. (Insecta: Diptera: Sciaridae)**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, 2001. (Entomology Circular, 186). Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN37200.pdf>. Acesso em: 05 maio 2010.

MEIRELES, R. C.; ARAÚJO, E. F.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, C. S.; REIS, L. S. Secafé. Metodologia para acelerar a germinação das sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 90-96, 2007.

MELO, F. P. L.; AGUIAR NETO, A. V.; SIMABUKURO, E. A.; TABARELLI, M. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 237-249.

MERCIER, H.; GUERREIRO FILHO, O. Propagação sexuada de algumas bromélias nativas da Mata Atlântica: efeito da luz e da temperatura na germinação. **Hoehnea**, São Paulo, v. 17, p. 19-26, 1990.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Propagação *in vitro* de bromélias ameaçadas de extinção. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 3., 1991, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 1991. res. 85.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, p. 247-249, 1992.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Dyckia madoei* an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanical Gardens Micropropagation News**, Kew, n. 6, p. 70-72, 1993.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 44, p. 120-124, 1994.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. The importance of tissue technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic Rain Forest canopy. **Selbyana**, Sarasota, FLA, v. 16, p. 147-149, 1995.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Volume 40: High-tech and micropropagation Vi. Berlin: Springer, 1997. p. 43-57.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E. Effects of NO₃⁻, NH₄⁺ and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 20, p. 387-392, 1997.

MILLS, H. A.; JONES JUNIOR, J. B. **Plant analysis handbook**. II. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Athens, GA: Micro- Macro Publishing, 1996.

MINAMI, K. **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. São Paulo: T.A. Editor, 1995. 128 p.

MOLLO, L. **Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na composição de *Alcantarea imperiales* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro***. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

MONTEIRO, A. C. B.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the organic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Oxon, 36, pp. 527-531, 2000.

MONTEIRO, R. F. **Estudos anatômicos e filogenéticos em *Bromelia* L. (Bromeliaceae, Bromelioideae)**. 2009. Dissertação (Mestre em Botânica) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2008.

MURARO, D. **Germinação em substratos alternativos ao xaxim e aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich.: Subsídios à produção sustentável**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

NAKANO, V. A. **Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes**. 2008. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e maturação de *Heliconia* sp.** 1994. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

NAS, M. N.; READ, P. E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 101, p. 189-200, 2004.

NIEDZ, R. P.; EVENS, T. J. Regulation of plant tissue growth by mineral nutrition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Oxon, v. 43, p. 370-381, 2007.

NIEVOLA, C.C. **Influência da nutrição nitrogenada sobre a atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio em bromélias cultivadas *in vitro***. 1997. 79 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

NIEVOLA, C. C.; MERCIER, H. A importância dos sistemas foliar e radicular na assimilação do nitrato em *Vriesea fosteriana*. **Bromélia**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 14-18, 1996.

NIEVOLA, C. C.; MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 9, p. 1387-1398, 2001.

NOVAK, J. From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual culture of potato and beneficial bacteria. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 97-103, 1998.

NOVENTA, A. Mercado de flores e plantas ornamentais cresce no Brasil. Mercado interno sustentou crescimento no país, enquanto EUA e Europa registraram queda. **Folha de São Paulo**, Acervo Hórtica, São Paulo, 2001. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/mercado/864369-mercado-de-florese-de-plantas-ornamentais-cresce-no-brasil.shtml>. Acesso em: 05 mar. 2011.

NYMAN, L. P.; DAVIS, J. P.; O'DELL, S. J.; ARDITTI, J.; STEPHENS, G. C.; BENZING, D. H. Active Uptake of Amino Acids by Leaves of an Epiphytic Vascular Plant, *Tillandsia paucifolia* (Bromeliaceae). **Plant Physiology**, Rockville, v. 83, p. 681-684, 1987.

O JARDINEIRO. Disponível em: http://www.jardineiro.net/br/banco/vriesea_sp.php. Acesso em: 05 mar. 2011.

OKLAHOMA STATE UNIVERSITY. Division of Agricultural Science and Natural Resources. **Fungus Gnats, *Bradysia* and *Sciara***. Stillwater, OK. Disponível em: <http://www.ento.okstate.edu/ddd/insects/fungusgnats.htm>. Acesso em: 10 maio 2011.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. J.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S.Moore. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2006.

OLIVEIRA, M. K. T.; NETO, F. B.; CÂMARA, F. A. A.; NUNES, G. H. S.; OLIVEIRA, F. A. Propagação *in vitro* da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). **Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 167-171, 2007.

PADMAWATHE, R.; QURESHI, Q.; RAWAT, G. S. Effects of selective logging on vascular epiphyte diversity in moist lowland forest of Eastern Himalaya, India. **Biological Conservation**, Barking, v. 119, p. 81-92, 2004.

PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; SILVEIRA, L. C. T.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZENETTINI, M. H.; BERED, F. Fertility of *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae) in southern Brazil. **American Journal of Botany**, New York, v. 94, n. 4, p. 683-689, 2007.

PAN, J. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.26, p.155-163, 1998.

PAOLI, A. A. S.; BIANCONI, A. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pseudima frutescens* (Aubl.) Radlk. (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 146-155, 2008.

- PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de bromélias**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- PENCE, V. C. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. In: BENSON, E. E. (Ed.). **Plant conservation biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1999. p. 227–250.
- PEREIRA, A. R.; PEREIRA, T. S.; RODRIGUES, A. S.; ANDRADE, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 22, n. 4, p. 1150-1162, 2008.
- PEREIRA, E. O.; NOGUEIRA, E. U.; SOUZA, M. F.; CAETANO, S. P.; LIMA, A. B. P. Desenvolvimento de protocolos para a micropropagação de espécies de Bromeliaceae. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 9., 2009, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2009.
- PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CASTRO, D. M.; RODRIGUES, H. C. A.; BEIJOS, L. A.; LAMEIRA, O. A. Caracteres anatômicos de fibras foliares de brotações de curauá propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Science**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 23-28, 2007.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.
- PÉREZ, E. R.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Análise dos alcoóis, ésteres e compostos carbonílicos em amostras de óleo fúsel. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 10-12, 2001.
- PICKENS, K. A.; AFFOITER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y.; WOLF, J. H. D. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. **HortScience**, St. Joseph, v. 38, p. 101-104, 2003.
- PINHEIRO, F.; BORGHETTI, F. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesebach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Schultes F.) Mez (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 27-35, 2003.
- PIZO, M. A. Frugivory and habitat use by fruit-eating birds in a fragmented landscape in southeast Brazil. **Ornitologia Neotropical**, Quebec, v. 15, p. 117-126, 1994.
- POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: and endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, n. 3, p. 273-279, 2004.
- POMPELLI, M. F.; FERNANDES, D.; GUERRA, M. P. Germination of *Dyckia encholirioides* (Gaudichaud) Mez var. *Encholirioides* under saline conditions. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 34, p. 759-763, 2006.

- POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 5, p. 117-126, 2005.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 42, p. 481-497, 1999.
- PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture Biotechnology**, Dhaka, Bangladesh, v. 1, p. 26–37, 1995.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 21, n. 3, p. 657-673, 2007.
- PURNHAUSER, L.; GYULLIA, G. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, p. 131–139, 1993.
- PY, C.; LACOEUILHE, J. J.; TEISSON, C. **L'ananas, sa culture, ses produits**. Paris: G. P. Maisonneuve & Larose, 1984. 562 p.
- RAMAGE, C. M. **The role of mineral nutrients in the regulation of plant development *in vitro***. 1999. 454 p. PhD (Dissertation) - The University of Queensland, Brisbane, Australia, 1999.
- RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Oxon, v. 38, p. 116–124, 2002.
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MÜLLER, C. V.; GUERRA M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 14, p. 1799-1808, 2005.
- REITZ, R. **Bromeliáceas e malaria – bromélia endêmica**. Iatajai: Flora Ilustrada Catarinense, 1983. 559 p. (Série 983).
- RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 69-71, 2005.
- RODRIGUES, T. M.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Assepsia de sementes de bromélia imperial para cultivo *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: ABCTP, 2003. p. 251.
- RUNDEL, P. W.; DILLON, M. O. Ecological patterns in the Bromeliaceae of the lomas formations of coastal Chile and Peru. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 212, p. 261-278, 1998.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 57-63, 2003.

SAJO, M. G.; MACHADO, S. R.; CARMELLOGUERREIRO, S. M. Aspectos estruturais de folhas de bromélias e suas implicações no agrupamento de espécies. In: LEME, E. M. C. (Org.). *Canistropsis* – Bromélias da Mata Atlântica. Rio de Janeiro: Salamandra, 1998. p. 102-111.

SANTOS, D. A. G.; NOÉ, W. P.; SANTOS, T. M. dos; ABREU, I. A. de; PIRES, L. L. Efeitos de tratamentos para aceleração de germinação de sementes da bromélia nativa do Cerrado Dycki spp. In: Congresso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales, 4.; Jornada Nacional de Floricultura, 10., 2008, Corrientes. **Livro de resúmenes...** Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária - INTA, 2008. p. 496-501.

SANTOS, D. S. **Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno.** 2009. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G.; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 1-8, 2005.

SARASAN, V. A.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. K. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. **In vitro Cell Developmental Biology – Plant**, Oxon, v. 42, p. 206-214, 2006.

SARMIENTO, R.; GARCIA, J. L.; MAZUELOS, C.; LINAN, J.; TRONCOSO, A. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral composition of olive seedlings. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 356, p. 156-161, 1994.

SATHYANARAYANA, B. N.; BLAKE, J. 1994. The effect of nitrogen sources and initial Ph of the media with or without buffer on *in vitro* rooting of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. (Ed.). **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 77–82.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, p. 635-649, 2005.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S.; COAN, A. I. Seed Morphology and Post-Seminal Development of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 6, p. 945-951, 2006.

SCHEIBLE, W. R.; GONZALEZ-FONTES, A.; LAUERER, M.; MULLER-ROBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 783–798, 1997a.

SCHEIBLE, W. R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E. D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot–root allocation in tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v. 11, p. 671–691, 1997b.

SEMA. **Lista oficial das espécies plantas ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especies-ameacadas>. Acesso em: 10 nov. 2010.

SHAUL, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. **BioMetals**, Heidelberg, v. 15, p. 309–323, 2002.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; BORTOLI, C. L. R.; QUOIRIN, M. In vitro multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 64, n. 2, p. 151-156, 2009.

SILVA, I. V. **Anatomia e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae (Poales) da Amazônia-MT**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SILVA, I. V.; SCATENA, V. L. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 2, p. 263-272, 2011.

SILVA, J. A. T.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v. 97, p. 397-410, 2003.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae. **Flora Neotropica**, New York, v. 14, p. 663-1492, 1977.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora Neotropica Monograph 14, parte 3: Bromelioideae**. New York: Hafner Press, 1979.

SOTIROPOULOS, T. E. Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and content of minerals, chlorophyll, praline and sugars in the apple rootstock M4 cultured in vitro. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, p. 177-180, 2007.

SOUZA, G. M.; ESTELITA, M. E. M.; WANDERLEY, M. G. L. Anatomia foliar de espécies brasileiras de *Aechmea* subg. *Chevaliera* (Gaudich. ex Beer) Baker, Bromelioideae- Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, p. 603-613, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: gui ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA JUNIOR, E. E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] CV. PÉROLA. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 31, n. 2, p. 147-151, 2001.

SPAARGAREN, D. H. The design of culture media base don the elemental composition of biological material. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 45, p. 97-102, 1996.

SRINATH, J.; BAGYARAJ, D. J.; SATYANARAYANA, B. N. Enhanced growth and nutrition of micropropagated *Ficus benjamina* to *Glomus mosseae* co-inoculated with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus coagulans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 19, p. 69-72, 2003.

STRINGHETA, A. C. O.; SILVA, D. J. H.; CARDOSO, A. A.; FONTES, L. E. F.; BARBOSA, J. G. Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 165-170, 2005.

SUTTER, E. G.; HUTZELL, M. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization to tissue-cultured plants to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 23, p. 303-312, 1984.

SUTTER, E. G.; SHACKEL, K.; DÍAZ, J. C. Acclimatization of tissue cultured plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 314, p. 115-119, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. San Francisco, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991.

TENG, W. L.; NICHOLSON, L. Pulse treatments of penicillin G and streptomycin minimize internal infections and have post treatment effects on the morphogenesis of ginseng root culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 531-535, 1997.

TILLICH, H. J. Ancestral and derived character states in seedling of monocotyledons. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (Ed.). **Monocots: systematics and evolution**. Melbourne: CSIRO, 2000. p. 221-229.

TILLICH, H. J. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 1413-1429, 2007.

TOMBOLATO, A. F. C.; TAKEBAYASHI, S. S. G.; COSTA, A. M. M.; QUIRINO, E. A. Bromélia (*Neoregelia carolinae*). In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: IAC, 1998. (Boletim Técnico, 174).

TOMLINSON, P. B. Comelinales - Zingiberales. In: METCALFE, C. R. (Ed.). **Anatomy of the monocotyledons: III**. Oxford: Clarendon Press, 1969. p. 193-294.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, CNPH, 1998. v. 1, 509 p.

- VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, New York, v.21, p.1175-1182, 2003.
- VAZ, A. P. A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; KERBAUY, G. B. Photoperiod and temperature effects on in vitro growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 411-415, 2004.
- VELIKY, I. A.; ROSE, D.; ZINK, M. W. Uptake of magnesium by suspension cultures of plant cells (*Ipomoea* sp.). **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 55, p. 1143–1147, 1976.
- VIEIRA, D. C. M.; SOCOLOWSKI, F.; MASSANORI, T. Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 183-188, 2007.
- VIEIRA DE ABREU, A.; AMENDOEIRA, F. C.; GOMES, G. S.; ZANON, C.; KAPLAN, M. A. C.; FRUTUOSO, V. S.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; WELLER, P. F.; BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P. T. Anti-allergic properties of the bromeliaceae *Nidularium procerum*: Inhibition of eosinophil activation and influx. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 5, p. 1966-1974, 2005.
- VINTERHALTER, B.; VINTERHALTER, D. True-to-the type *in vitro* propagation of *Achmea fasciata* Baker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 57, p. 253-263, 1994.
- WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S.; GIULIETTI, A. M. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, 2006. v. 5.
- WILKINSON, H. P. The plant surface (mainly leaf). In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. (Ed.). **Anatomy of the dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1979. v. 1, p. 97-162.
- WILLIAMS, R. R. Factors determining mineral uptake *in vitro*. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 289, p. 165-169, 1991.
- WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition in vitro – a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 41, p. 237–251, 1993.
- WILLIAMS, R. R. The chemical micro-environment. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 405-439.
- WINKLER, M.; HULBER, K. U.; HIETZ, P. Effect of canopy position on germination and seedling survival of epiphytic bromeliads in a mexican humid Montane Forest. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, p. 1039–1047, 2005.
- WOLF, J. H. D. The response of epiphytes to anthropogenic disturbance of pine-oak forests in the highlands of Chiapas, Mexico. **Forest Ecology and Management**, v. 212, p. 376–393, 2005.

YANOVIK, S. P.; NADKARNI, N. M.; GERING, J. C. Arthropods in epiphytes: a diversity component that is not effectively sampled by canopy fogging. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 12, p. 731-741, 2003.

ZINDLER-FRANK, E.; HONOW, R.; HESSE, A. Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 158, p. 139-144, 2001.