

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**KAMILA VILAS PESSOTTI**

**PROPAGAÇÃO e CONSERVAÇÃO *in vitro* de *Vriesea sucrei* (L.B.  
Smith & R.W. Read): Bromeliaceae em perigo de extinção  
da Mata Atlântica**

**VITÓRIA  
2009**

KAMILA VILAS PESSOTTI

**PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Vriesea sucrei* (L.B. Smith & R.W. Read): Bromeliaceae em perigo de extinção da Mata Atlântica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal.  
Orientação: Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.  
Co-orientação: Diolina Moura Silva

**VITÓRIA  
2009**

**KAMILA VILAS PESSOTTI**

**PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Vriesea sucrei* (L.B. Smith  
& R.W. Read): Bromeliaceae em perigo de extinção  
da Mata Atlântica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em

de 2009

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador**

---

**Profª Drª Queila de Souza Garcia**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Examinador externo**

---

**Profª Drª Maria do Carmo Batitucci**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Examinador Interno**

**A todos que ajudaram, incentivaram e torceram  
pela a realização desse trabalho.**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus;

A Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade;

A FAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao professor e amigo Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol, pela orientação, compreensão nos momentos mais difíceis e principalmente pela confiança;

A professora Diolina Moura Silva, pela orientação, conselhos e apoio;

A professora Camilla Millanez, pela enorme ajuda na realização das análises anatômicas. Valeu xará!

Ao professor Marco Antônio, cujo auxílio durante as análises estatísticas foi de fundamental importância;

Ao Instituto Kautsky, pela doação do material biológico;

Aos colegas de mestrado Ana Paula, Bruna, Elias, Emerson, Gabrielas, Liana, Mariela, Poliana, Sabrina, Sigrid, Tarsila e Wilka pelos momentos de descontração e por estarem sempre dispostos a ajudar;

Ao Rubinho, meu esposo, pela compreensão, companheirismo e apoio nos momentos mais críticos;

A minha família por sempre me apoiar;

As amigas Andréa, Melyna, Bárbara e Clarissa;

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal Ricardo, pela ajuda na parte burocrática para a conclusão da minha dissertação;

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, o meu respeito e eterna gratidão!

## RESUMO

As técnicas de propagação *in vitro* permitem a obtenção de grandes quantidades de mudas uniformes, de alta qualidade fisiológica e fitossanitária. Com isso, pode-se promover a multiplicação rápida e geneticamente confiável, bem como a preservação de espécies ameaçadas de extinção. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo para a propagação e conservação *in vitro* e *ex situ* de *Vriesea sucrei*, visando à implantação de um banco de germoplasma dessa Bromeliaceae ameaçada de extinção. Sementes de *V. sucrei* foram inoculadas em meios de cultura e substratos *in vitro*. Foram testados sete diferentes meios de germinação: MS líquido, MS gelificado, K líquido, K gelificado, Areia lavada, fibra de coco e controle (água destilada). O índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação e de sobrevivência foram calculados. Também foram realizadas medidas de crescimento inicial como altura e número de folhas das plântulas germinadas. Plântulas provenientes da germinação *in vitro* foram submetidas aos tratamentos de conservação, que consistiram de uma combinação fatorial (2x3x2x2) das seguintes variáveis fisiológicas: formulação do meio de cultura (MS e K), concentração de macro e micronutrientes do meio de cultura (1, ½ e ¼), estado físico do meio de cultura (gelificado e líquido) e temperatura de incubação (15°C e 25°C). Após 120 dias em cultura, foram realizadas medidas de porcentagem de sobrevivência, incremento em altura, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, teores de clorofila e análise anatômica do limbo. Plântulas de *V. sucrei* com seis meses de idade, obtidas por meio da germinação *in vitro*, foram utilizadas como explantes para a indução de brotações laterais. Os tratamentos de indução de brotações laterais consistiram de uma combinação fatorial (2x2x4) de dois meios de cultura (MS e K), dois estados físicos do meio (gelificado e líquido) e quatro combinações de auxinas (AIA e ANA), citocininas (cinetina e BAP), e uma amina (adenina) em diferentes proporções. A eficiência da multiplicação das brotações laterais foi calculada pela porcentagem de plântulas que geraram brotações laterais em cada tratamento e número médio de brotações produzidas por plântula. A germinação *in vitro* de sementes de *V. sucrei* nos tratamentos MS líquido, K líquido, areia e controle se mostram igualmente efetivos, apresentando altas taxas de germinação, sobrevivência e

IVG. Os tratamentos contendo meio nutritivo (MS líquido e K líquido) seriam os mais indicados para a obtenção de plantas com crescimento inicial mais vigoroso em altura e número de folhas. O crescimento naturalmente lento da espécie *V. sucrei* favoreceu sua conservação em bancos de germoplasma *in vitro*. A baixa temperatura de 15°C foi o fator determinante para a redução do crescimento *in vitro*, sem, contudo, comprometer a sobrevivência das plantas. O tratamento ½ MS líquido a 15°C apresentou alta porcentagem de sobrevivência, plantas com crescimento reduzido, altos teores de clorofila e estrutura anatômica sem anormalidades. Com base nestes resultados, podemos sugerir que esse tratamento seja o mais indicado para a implantação de bancos de germoplasma *in vitro* de *V. sucrei*. Quanto ao experimento de indução de brotações laterais, o tratamento MS líquido suplementado com 0,5mg/L de ANA e 2mg/L de BAP promoveu maior porcentagem de plantas com brotações laterais (80%) e maior número de brotações laterais/planta (2,3). No entanto, todos os tratamentos testados geraram um número baixo de brotações laterais/planta.

**Palavras – Chave:** *Vriesea sucrei*, *in vitro*, conservação, propagação.

## ABSTRACT

The *in vitro* propagation techniques allow the production of large numbers of uniform plantlets, with high physiological and phytosanitarian quality. Thus, it enables a rapid and genetically reliable multiplication, as well as the preservation of species threatened of extinction. The objective of the present study was to establish a protocol for the *in vitro* and *ex situ* propagation and conservation of *Vriesea sucrei*, in order to implant a germoplasm bank for this Bromeliaceae threatened of extinction. Seeds of *V. sucrei* were inoculated *in vitro* on culture mediums and substrates. Seven different germination treatments were tested: MS liquid, MS gelled, K liquid, K gelled, washed sand, coconut fiber and control (distilled water). Germination and survival percentages, as well as the germination speed index (GSI), were calculated. Initial growth measurements, such as height and number of leaves, were registered. Plantlets deriving from *in vitro* germination were submitted to conservation treatments, consisting of a factorial combination (2x3x2x2) of the following physiological variables: culture medium formulation (MS and K), concentration of macro and micronutrients of the culture medium (1, ½ and ¼), physical state of the culture medium (gelled and liquid) and incubation temperature (15°C and 25°C). The survival rate, increment in height, number of leaves, number of roots, length of the longest root, chlorophyll content and anatomical leaf structure were evaluated after 120 days in culture. *V. sucrei* plantlets with six months of age, obtained from *in vitro* germination, were used as explants to induce lateral buds. Lateral bud induction treatments consisted of a factorial combination (2x2x4) of two culture mediums (MS and K), two physical states of the culture medium (gelled and liquid) and four combinations of auxins (IAA and NAA), cytokinins (cinetin and BAP) and one amine (adenine) in different proportions. Multiplication efficiency was calculated as the percentage of seedlings that gave rise to adventitious shoots as well as the mean number of shoots/seedling. The *in vitro* germination of *V. sucrei* seeds on MS liquid medium, K liquid medium, sand and control were equally efficient, presenting high GSI, germination and survival rates. Treatments containing nutritive media (MS liquid and K liquid) would be the most indicated to obtain plants with a more vigorous initial growth in height and number of leaves. The natural slow growth of the species *V. sucrei* favored



its conservation in *in vitro* germplasm banks. The low temperature of 15°C was the main factor that determined the reduction of the *in vitro* growth, without, however, compromising the survival rates. The ½ MS liquid medium at 15°C presented high survival rate, plants with diminished growth, high chlorophyll content and anatomical leaf structure with no abnormalities. These results suggest that this treatment would be the most indicated to implant an *in vitro* germplasm bank for *V. sucrei*. As for the lateral bud induction experiment, MS liquid media supplemented with 0,5 mg/L ANA and 2 mg/L BAP gave rise to a higher percentage of plants with lateral buds and also a higher number of lateral buds/plant. However, all treatments tested generated a low number of lateral buds/plant.

**Key Words:** *Vriesea sucrei*, *in vitro*, conservation, propagation.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. OBJETIVO GERAL.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 A família Bromeliaceae.....	15
3.2 Propagação natural de bromélias.....	21
3.3 Importância ecológica das bromélias na ciclagem de nutrientes.....	22
3.4 A espécie <i>Vriesea sucrei</i> .....	23
3.5 Propagação <i>in vitro</i> de Bromeliaceae.....	25
3.6 Conservação <i>in vitro</i> de Germoplasma.....	28
3.7 Meios de cultivo.....	30
3.7.1 Cultivo em meio sólido.....	31
3.7.2 Cultivo em meio líquido.....	32
4. REFERÊNCIAS.....	34
<b>5. CAPÍTULO 1 – Germinação e Conservação <i>in vitro</i> de Germoplasma de <i>Vriesea sucrei</i>.....</b>	<b>43</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	44
5.2 OBJETIVO.....	47
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

5.5 CONCLUSÕES.....	74
5.6 REFERÊNCIAS.....	75
<b>6. CAPÍTULO 3 - Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Vriesea sucrei</i>.....</b>	<b>81</b>
6.1 INTRODUÇÃO.....	82
6.2 OBJETIVO.....	84
6.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
6.5 CONCLUSÕES.....	93
6.6 REFERÊNCIAS.....	94
<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é um bioma caracterizado por uma alta diversidade de espécies vegetais, sendo estimada a ocorrência de cerca de 20.000 espécies, entre as quais 6.000 são consideradas endêmicas correspondendo, aproximadamente, 3% das espécies endêmicas mundial (RECH FILHO et al., 2005). O processo progressivo de devastação deste bioma e seus ecossistemas associados causaram uma redução impressionante da sua biodiversidade, o que provocou a erosão genética de seus componentes (MYERS et al., 2000). Essa devastação tem levado a maior parte das bromélias, importantes componentes deste bioma, ao risco de extinção (KLEIN, 1990), como é o caso da espécie *Vriesea sucrei* classificada criticamente em perigo (BIODIVERSITAS, 2000).

As bromélias têm como característica marcante a disposição em roseta de suas folhas, propiciando a formação de um reservatório de água e nutrientes (REITZ, 1983) com grande importância ecofisiológica. Este reservatório, além de servir de fonte de nutrientes para as bromélias, forma um micro ambiente onde diversas espécies animais o utilizam para forrageamento, reprodução e refúgio contra predadores (ROCHA et al., 1997). Tem sido relatado que algumas espécies vegetais encontram nelas o ambiente ideal para germinar e iniciar seu desenvolvimento (REITZ, 1983).

As bromélias vêm fascinando e adquirindo popularidade pela sua enorme beleza, fazendo com que sejam amplamente utilizadas em projetos paisagísticos. Isso tem acarretado sérios problemas ecológicos, devido à exploração indiscriminada dessas plantas que são comercializadas no mercado interno e externo para colecionadores e produtores europeus e norte-americanos (ANDRADE; DEMATTÊ, 1999).

Visando contornar essa problemática, uma das alternativas consiste na produção de plantas de bromélias para serem usadas em programas de educação ambiental, na reintrodução em florestas ou mesmo em programas de reflorestamento desenvolvidos por órgãos públicos e por iniciativa privada.

Nos últimos 40 anos, a propagação *in vitro* representa um importante conjunto de tecnologias em todas as áreas da biologia vegetal. Auxilia na compreensão dos processos do desenvolvimento vegetal e nas práticas de conservação dos recursos genéticos vegetais (WITHERS; WILLIAMS, 1998). As técnicas de propagação *in vitro* permitem a obtenção de grandes quantidades de mudas uniformes, de alta qualidade fisiológica e fitossanitária. Com isso, pode-se promover a multiplicação rápida e geneticamente confiável, bem como a preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção (RECH FILHO, 2004).

Devido a sua importância comercial e seu status de conservação, existe um interesse crescente na propagação vegetativa de bromélias *in vitro*, visto que esta técnica estimula maior número de brotações laterais, produzindo maior quantidade de afilhos por planta ao ano em relação ao método natural.

Alem disso, a propagação *in vitro* apresenta muitas vantagens em relação aos métodos convencionais de propagação. Proporciona a formulação de protocolos para a conservação de germoplasma e propagação massal clonal ou através da germinação das sementes. Estas estratégias podem ser utilizadas em escala comercial, diminuindo a pressão extrativista sobre as espécies de apelo ornamental como a bromélia *Vriesea sucrei*, objeto de estudo deste trabalho.

## **2. OBJETIVO GERAL**

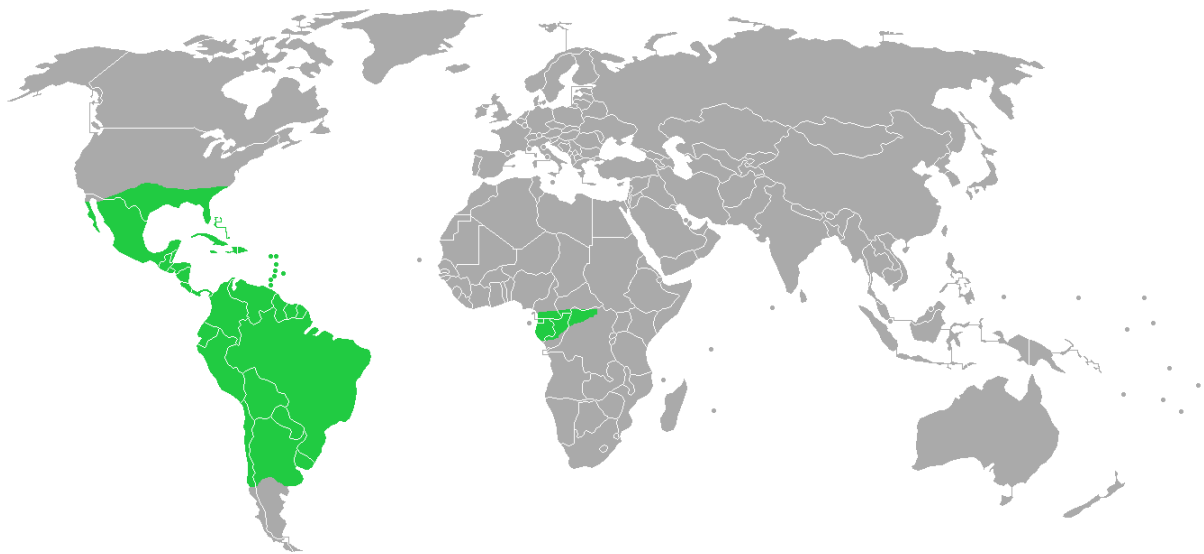
Estabelecer um protocolo para a propagação e conservação *in vitro* e *ex situ* de *Vriesea sucrei*, visando à implantação de um banco de germoplasma dessa Bromeliaceae ameaçada de extinção da Mata Atlântica.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A Família Bromeliaceae

As bromélias são típicas do continente Americano (Figura 1) e é provável que tenham sido originadas na região dos Andes, de onde disseminou e alcançou a floresta tropical a cerca de duzentos mil anos (POMPELLI; GUERRA, 2004). A família Bromeliaceae apresenta aproximadamente 51 gêneros e cerca de 3.500 espécies (COFFANI NUNES, 2002), todas nativas do continente Americano, com exceção de uma única espécie, *Pitcairnia feliciana*, encontrada na África ocidental (BENZING, 2000). Estima-se que 40% das espécies e 73% dos gêneros ocorram no Brasil (RECH FILHO, 2004).

As bromélias estão presentes em todo território brasileiro, desde a caatinga aos campos de altitude, passando pelos campos rupestres, Floresta Amazônica, restinga e, especialmente, na Mata Atlântica (LEME; MARIGO, 1993). A região leste é a que apresenta maior ocorrência de bromélias, sendo que 81,8% ocorrem na Mata Atlântica (COSTA; FONTOURA, 1989). A Floresta Atlântica é considerada um dos centros de diversidade da família Bromeliaceae, e vários de seus gêneros e espécies ocorrem exclusivamente nesse ecossistema, ou seja, são endêmicos (NUNES, 2002). O endemismo é uma característica marcante das bromeliáceas. Embora existam espécies espalhadas por extensas áreas, outras, entretanto, possuem suas populações confinadas em áreas restritas ou isoladas (LEME, 1984).



**Figura 1-** Distribuição geográfica das bromélias no mundo (Fonte: BENZING, 2000).

As bromélias são influenciadas pelo clima e pela altitude, variando em sua composição florística conforme a área estudada (ARAGÃO, 1967; SUDGEN, 1981; REITZ, 1983; GENTRY; DODSON, 1987; HIETZ; HIETZSEIFERT, 1995). Elas sofrem influência do microclima para se distribuírem no interior da floresta, de acordo com a luminosidade e umidade relativa do ar (RECH FILHO, 2004). Segundo Reitz (1983), são conhecidos quatro níveis de fixação, do solo à copa das árvores. No primeiro nível, o solo, onde a luminosidade é pouca e a umidade relativa do ar é elevada, habitam as bromélias esciófilas, formando algumas vezes extensos tapetes. Estas são responsáveis, em parte, pela umidade do ambiente florestal, devido à evaporação da água que armazenam. No segundo nível, associado à região intermediária dos troncos das árvores do extrato dominante, bem como a arvoretas e arbustos, encontram-se as espécies médio-esciófilas. Este nível se encontra entre um e oito metros acima do solo e ainda há grande umidade e luminosidade reduzida. O terceiro nível abriga as bromélias que demandam intensidade média de luz e mais umidade de que as espécies heliófilas. Estas se localizam nas bases dos ramos que formam as copas das árvores, oito a vinte metros acima do solo. Neste nível encontram-se a maior variedade de bromélias, entre elas as de maior porte. O quarto nível abriga as espécies heliófilas,



acima de vinte metros do solo, na copa das árvores, onde a luminosidade é intensa e a umidade relativa do ar é consideravelmente menor (REITZ, 1983).

A família Bromeliaceae é excepcionalmente bem adaptada à vida epifítica, constituindo a maioria, juntamente com Orchidaceae e Araceae, dos ocupantes das árvores nos ambientes tropicais localizados entre o sul dos Estados Unidos e a região da Patagônia (KRESS, 1986; BENZING, 1990). Podem ser consideradas componentes essenciais em ecossistemas naturais, pois ampliam a diversidade biológica pela oferta de água, nutrientes, microhábitats, abrigo, alimentação e sítio de reprodução para inúmeras espécies animais e vegetais (BENZING, 1995; ROCHA et al., 1997; ROCHA et al., 2004), incluindo algas, protistas, invertebrados e vertebrados (WHEELER, 1921 e 1942; LAESSLE, 1961; DEJEAN; OLMSTED, 1997; WITTMAN, 2000; DIAS; BRESCOVIT, 2004). Hadel (1989) descreveu 27 tipos diferentes de organismos associados a estes pequenos corpos d'água. Em alguns casos, estão presentes orquídeas e algumas aráceas como *Philodendron selloun* e *P. melanorrhizum* (REITZ, 1983; KALIFA, 1995; POMPELLI, 2002).

A família bromeliaceae está dividida em três subfamílias: Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae que utilizam solos, rochas e outras plantas como substrato. O hábito epifítico é registrado nas três subfamílias (SMITH; DOWNS, 1974), predominando entre as bromélias.

A primeira subfamília é composta por 536 espécies (RUNDEL; DILLON, 1998), engloba em sua maioria epífitas e eventualmente terrícolas, com frutos em forma de baga que são dispersos por animais (ARAGÃO, 1999; BENZING, 1980; FISCHER; ARAUJO, 1995).

A subfamília Tillandsioideae consiste em 810 espécies (RUNDEL; DILLON, 1998). *Tillandsia*, *Vriesea* e *Guzmania* são os gêneros mais comumente comercializados. É composta por plantas exclusivamente epífitas, com sementes plumosas dispersas pelo vento (FISCHER; ARAUJO, 1995; ARAGÃO, 1999; BENZING, 1980).

Pitcairnioideae compreende 750 espécies (RUNDEL; DILLON, 1998) e incluem os gêneros *Puya*, *Dyckia*, e *Pitcairnia* (MERCIER; KERBAUY, 1997). Esta subfamília é considerada como sendo a mais primitiva (MEDINA; TROUGHTON 1974; GALETTO;

BERNARDELLO, 1992), porém, estudos moleculares recentes têm sugerido *Tillandsioideae* (RUNDEL; DILLON, 1998). Ela é composta por plantas de hábitos exclusivamente terrícolas, cujas sementes aladas são dispersas pelo vento (ARAGÃO, 1999; BENZING, 1980).

Bromélias são majoritariamente epífitas e as raízes servem principalmente como elemento de fixação, sendo, portanto, a constituição destas muito firmes. Todas elas possuem caule, que na maioria dos casos é muito curto e retorcido. As folhas costumam apresentar uma parte alargada na base, chamada de bainha, cuja coloração é muito variada para as diferentes espécies (RECH FILHO, 2004). A família apresenta grande variabilidade de formas, sendo em geral plantas bem características e ornamentais. Segundo Rizzini (1997) e Benzing (2000) os diferentes habitats e, especialmente, a natureza do substrato influenciam no aspecto da planta, que pode variar amplamente em tamanho e coloração das folhas, assim como na morfologia das flores.

As bromélias epífitas desenvolveram estratégias específicas, como escamas e os tanques ou cisternas, para se adaptarem ao suprimento irregular de água e de nutrientes, e aos extremos de temperatura e luminosidade (BONNET, 2006). As bromélias que investem na densa cobertura de tricomas são denominadas bromélias atmosféricas e as que acumulam água e matéria orgânica nas cisternas, em maior ou menor proporção, são denominadas formadoras de tanque, (BENZING, 1990). Esta categorização, que divide o grupo de bromélias em atmosféricas e tanque, é baseada nas suas estratégias nutricionais, mas naturalmente possui fases intermediárias, como aquelas plantas com cisternas rudimentares e raízes com capacidade de absorção encontradas predominantemente em ambientes terrestres (SMITH; DOWNS, 1974; BENZING, 1976; LEME; MARIGO, 1993). A estratégia nutricional adotada pelas bromélias e ao seu habitat epífito relaciona-se o seu lento crescimento (BONNET, 2006).

A família Bromeliaceae possui uma longa história de uso etnobotânico, especialmente associada aos povos pré-hispânicos americanos. Pelo menos nove categorias de usos não exclusivos podem ser associadas a esta família, incluindo ser fonte de fibras,

alimentos, forragem e medicamentos além de uso ornamental e místico (BENNETT, 2000). Estas categorias refletem, principalmente, antigas aplicações e percepções indígenas e nem sempre coincidem com o seu uso moderno (BENZING, 2000). O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.), único representante da família cultivado como fonte de alimento, está fortemente associado à história dos povos das Américas tanto como alimento quanto como elemento simbólico de rituais (LEVINS, 2005). Espécies de bromélias têm sido empregadas pelos aborígenes americanos como fontes de fibras desde antes da chegada de Colombo ao Novo Mundo. Entre estas, cita-se o próprio abacaxi (BRUCHER, 1989; BENNETT, 1992b); *Aechmea magdalenae* (André) André ex Baker (TICKTIN et al., 2003; TICKTIN; NANTEL, 2004); *Tillandsia usneoides* (L.) L. (BENNETT, 1986; MABBERLEY, 1987) e *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez (BENZIG, 2000; BSI, 2005).

Os frutos do abacaxi também contêm uma enzima denominada bromelina que os protege de predação por larvas de insetos e cuja importância está em ascensão devido a sua aplicabilidade na indústria farmacêutica (em face de sua atividade anti-helmíntica, antiinflamatória e anti-cancerígena) e na indústria química (amaciante de carnes vermelhas, hidrolizante de complexos proteína-taninos na produção de cerveja, pães, leite de soja e ovos desidratados) (FREIMAN; SABAA SRUR, 1999). Outra enzima denominada hemisfericina, produzida por representantes do gênero Bromeliaceae apresenta também grande potencialidade de ser usada nestes mesmos segmentos industriais (CATHCART, 1995).

Nas últimas décadas, as bromélias tornaram-se mais amplamente empregadas como plantas ornamentais. Originalmente encontradas apenas em jardins botânicos ou de colecionadores europeus, ganharam popularidade entre paisagistas e jardineiros devido à beleza de suas formas e cores, durabilidade das inflorescências, baixa demanda de cuidados e fácil adaptabilidade a jardins pequenos (BENZIG, 2000; KISS, 2001; BSI, 2005; SCHOELLHORN, 2005). Hoje as bromélias são consideradas como elementos requintados e exóticos de jardins ao redor do mundo (STEENS, 2003; BRANDIES, 2004). O uso ornamental de bromélias no Brasil foi iniciado a partir da década de setenta, quando *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, uma planta nativa do Rio de Janeiro, despertou grande procura por parte de consumidores de plantas ornamentais.

A insuficiência de produção de plantas desta espécie provocou o extrativismo, que também se difundiu para outras espécies de menor expressão comercial. Iniciava-se nesta época, portanto, o ciclo de extrativismo de bromélias com finalidade lucrativa no Brasil. Este processo, primeiramente observado no Rio de Janeiro, também ocorreu em vários outros Estados (COFFANI-NUNES, 1997).

Frente à crescente demanda por bromélias, associada à alta disponibilidade delas em ambiente natural e o acesso amplamente facilitado, o extrativismo no Brasil teve contínua ampliação e pouco investimento se fez no sentido de implementar sistemas de cultivo destas plantas (SBB, 2005). Esta ação predatória, associada à redução e fragmentação da Floresta Atlântica, sem a reposição natural dos estoques nas florestas, provocou grandes danos ambientais, entre estes a redução da diversidade específica de bromélias e de outras espécies co-existentis (NAHOUM, 1994; LEME, 1998; ANACLETO, 2001). Em 1990, registra-se que várias espécies de bromélias estavam ameaçadas de entrar em processo de extinção como, por exemplo: *Aechmea apocalyptica* Reitz e *Vriesea pinottii* Reitz (BRASIL, 1992). Dentre as 107 espécies oficialmente listadas como extintas ou ameaçadas de extinção em Brasil (1992), 15 são bromélias.

Um efeito paralelo da exploração extrativista de bromélias é o impacto severo sobre o xaxim – *Dicksonia selowiana* (Presl.) Hook.– uma samambaia primitiva arborescente – cuja parte aérea é fonte das fibras utilizadas como substrato para bromélias (e orquídeas). Esta espécie nativa da Floresta Atlântica está inserida em listas oficiais nacionais e internacionais de espécies altamente ameaçadas de extinção devido à intensa exploração comercial relacionada à produção de flores e jardinagem (IBAMA, 2005).

A comercialização das bromélias oriundas do extrativismo é praticada por um preço insatisfatório em função da baixa qualidade visual que as plantas apresentam, uma vez que estas são retiradas das florestas e disponibilizadas para venda sem que recebam tratamentos culturais adequados. Assim, passa a ser uma atividade fortuita e sem eficiente conexão com potenciais mercados receptores e sem regularidade de comercialização, porém mesmo assim determina um expressivo acréscimo financeiro nas famílias

envolvidas com o extrativismo, ampliando desta forma a pressão extrativista (NEGRELLE et al., 2005).

### 3.2 Propagação natural de bromélias

A propagação pode ser tanto sexuada quanto assexuada. Segundo Reitz (1983), a autofecundação parece ser rara em bromeliáceas, uma vez que a maioria das flores estudadas são protândrica. As bromélias representam cerca de 30% dos recursos alimentares usados por beija-flores (SAZIMA et al., 1995, 1996) e por morcegos (SAZIMA et al., 1999) na Floresta Atlântica. Apesar da elevada importância que apresenta nas florestas Neotropicais, pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva da família Bromeliaceae (MARTINELLI, 1997). A ornitofilia é predominante em Bromeliaceae (SAZIMA et al. 1996; MARTINELLI, 1997; VARASSIN; SAZIMA, 2000). *Vriesea sucrei* é uma espécie ornitófila. Esta apresenta as principais características de bromélias ornitófilas como brácteas florais com tonalidade vermelha, flores amarelas, tubulares, alta produção de néctar com concentração de açúcares mediana e antese diurna (SAZIMA et al., 1996; SAZIMA et al., 2000).

A polinização por morcegos foi registrada pela primeira vez no gênero *Vriesea* Lindl. por Vogel (1969). As bromélias quiropterófilas possuem flores cuja coloração das pétalas varia de branco-amarelada a vermelho-acastanhada, corola tubular alargada, antese noturna, grande quantidade de néctar e odor desagradável. Até o momento, a maioria dos registros de polinização de bromélias por morcegos encontra-se no gênero *Vriesea* (KAEHLER; VARASSIN; GOLDENBERG, 2005).

Insetos são polinizadores menos comuns e, quando ocorrem, a polinização é realizada por abelhas ou borboletas. As bromélias polinizadas por abelhas apresentam pétalas azuis, inflorescências densas, flores com tubo estreito e nectários ocultos, quando presentes (BENZING, 2000). Abelhas são polinizadoras de algumas espécies da subfamília Bromelioideae (SIQUEIRA FILHO, 1998; ARAÚJO et al., 2004) e provavelmente de algumas da subfamília Pitcairnioideae (VARADARAJAN; BROWN,

1988). As bromélias polinizadas por borboletas apresentam características semelhantes às polinizadas por abelhas.

A disseminação das sementes contidas nos frutos do tipo baga é realizada por animais (zoocoria), ao passo que as sementes das cápsulas (*V. sucrei*) são disseminadas pelo vento (anemocoria).

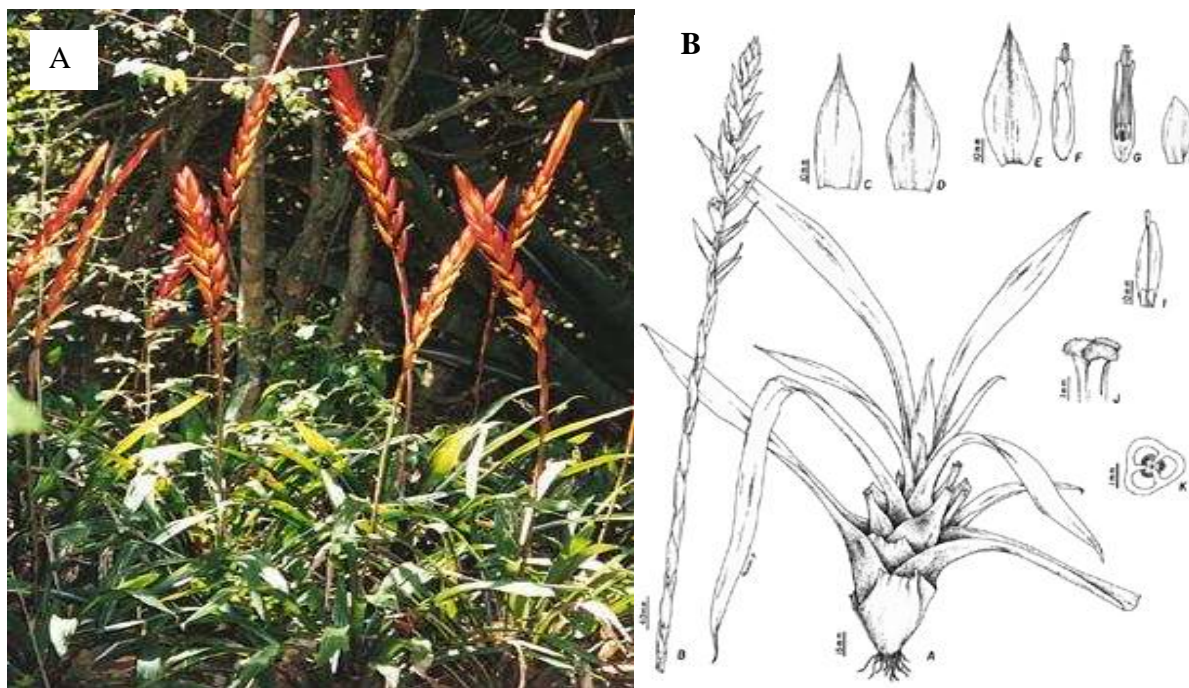
### **3.3 Importância ecológica das bromélias na ciclagem de nutrientes**

A exuberância das florestas tropicais e sua paradoxal localização em solos geralmente pobres em nutrientes podem ser explicadas pela complexidade dos processos de ciclagem de nutrientes e por uma série de mecanismos, estruturas e estratégias desenvolvidas ao longo de sua evolução, que promovem a captura e conservação de nutrientes (HERRERA et al., 1978; JORDAN, 1991). Em referência à interceptação de íons provenientes da chuva pela floresta, Jordan e outros (1980) detectaram redução na quantidade de nutrientes presentes na água de chuva após esta atravessar o dossel da floresta, evidenciando a importância da flora epifítica como um dos mecanismos de incorporação de nutrientes em florestas tropicais. Oliveira e Coelho Netto (2001) verificaram que o ambiente das copas das árvores em florestas de diferentes idades na Ilha Grande (RJ) atua como uma zona de captura de nutrientes de origem atmosférica. Dentre estes mecanismos de captura e conservação de nutrientes, papel especial é reservado ao material epifítico como as bromélias, que é capaz de incorporá-los, interceptando as entradas da atmosfera e armazenando-os para liberação posterior e subsequente uso por outros vegetais (LOWMAN; NADKARNI, 1995). Segundo Coxson e Nadkarni (1995), os epífitos, como os demais vegetais, contêm estoque de minerais que são incorporados durante o seu crescimento e removidos quando morrem. Assim, através desta captura, estocagem e liberação, estes podem afetar o padrão geral de ciclagem mineral do ecossistema onde ocorrem.

### 3.4 A espécie *Vriesea sucrei*

O gênero *Vriesea*, representado neste trabalho por *Vriesea sucrei* (L. B. Smith & R. W. Read), compreende 257 espécies distribuídas nas três Américas desde o México e Cuba até o sul do Brasil e nordeste da Argentina (SMITH; DOWNS, 1979).

A espécie *V. sucrei* (Figura 2) é endêmica da região de Cabo Frio no Rio de Janeiro, considerada pela WWF/IUCN como um dos 12 Centros de Diversidade Vegetal do Brasil (ARAUJO, 1997). Existe uma grande riqueza de habitats em Cabo Frio, desde extensas restingas e altas dunas até grandes lagunas e depósitos aluviais, maciços costeiros das penínsulas de Armação de Búzios e Cabo Frio e serras mais acidentadas como a de Sapiatiba (ARAUJO, 1998). Nos baixos mais úmidos entre as dunas, onde se forma matas baixas criando um ambiente sombreado, são encontradas populações de *V. sucrei* (ARAUJO, 1998).



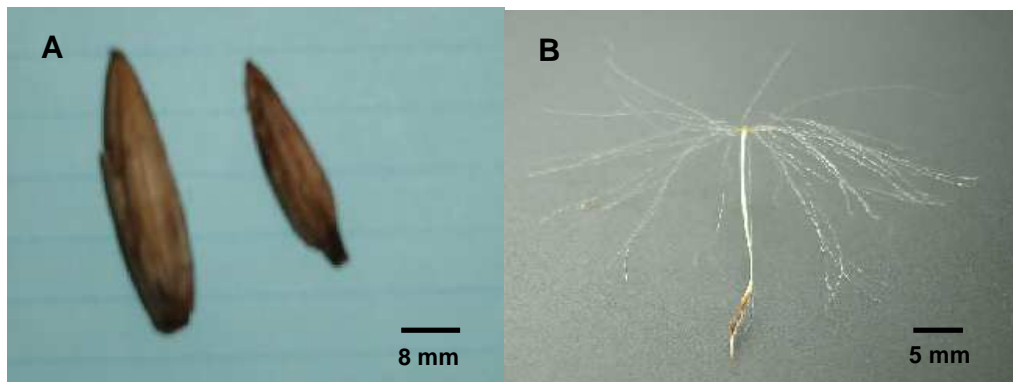
**Figura 2** – Aspectos morfológicos de *Vriesea sucrei* L. B. Smith & R. W. Read **(A)** em condições de campo; **(B)** (a) Hábito da planta com escapo e inflorescência; (b) Bráctea escapal inferior; (c) Bráctea escapal superior; (d) Bráctea floral; (e) Flor; (f) Secção longitudinal da flor; (g) Sépala; (h) Pétala com estame; (i) Estigma; (k) Secção transversal do ovário. (Fonte: [www.reservataua.com.br](http://www.reservataua.com.br))

A espécie *V. sucrei* possui folhas que podem chegar a medir 30,3 cm de largura (Figura 2). Estas folhas formam rosetas com 25 cm de largura e cerca de 15 cm de altura. A planta florida pode atingir 75 cm de altura. As folhas apresentam em média 50 cm de altura com superfície adaxial de aspecto coriáceo e coloração esverdeada, enquanto que a superfície abaxial apresenta coloração escura arroxeada (Figura 3). Sua inflorescência localiza-se na ponta de um escapo floral de até 30 cm de comprimento e possui forma de espada, podendo atingir de 20 a 30 cm de comprimento, com brácteas florais vermelhas e pétalas amarelas (REILLY, 2006). Possui fruto do tipo cápsula e sementes com apêndice plumoso (Figura 4). As sementes são pequenas (~ 5mm) e seu apêndice plumoso auxilia sua dispersão anemocórica.



**Figura 3-** Coloração esverdeada da superfície adaxial e arroxeada da superfície abaxial da folhagem de *Vriesea sucrei*.





**Figura 4** – Detalhe do fruto e semente de *V. sucrei*. **(A)** fruto tipo cápsula; **(B)** semente com apêndice plumoso. (Foto: Kamila Pessotti – 28/08/2007)

### 3.5 Propagação *in vitro* de Bromeliaceae

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e inoculado em meio nutritivo artificial, suplementado com fitorreguladores, ambiente asséptico e condições adequadas de luz e temperatura para promover a multiplicação somática a partir dos explantes. Esse processo baseia-se na totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula nucleada do organismo vegetal pode ser induzida a sofrer desdiferenciação e produzir uma planta completa com todos os tecidos e órgãos que lhe são característicos e todas suas funções orgânicas (FEVEREIRO; CAETANO; SANTOS, 2001).

Entre os principais métodos de cultura de tecidos estão a cultura meristemática, a microenxertia, a cultura de embriões, a cultura de calos, a suspensão celular, a polinização e fertilização *in vitro*, a cultura de ovários, a cultura de protoplastos e a embriogênese somática (FLORIANO, 2004).

A micropropagação pode ser feita via gemas pré-existentes ou cultura de calos derivados de diferentes tecidos. Por sua vez, a cultura de calos visa à regeneração via organogênese, i.é., formação de gemas adventícias, ou embriões somáticos (TEIXEIRA; SONDAHL; KIRBY, 1993).

Novos órgãos como partes aéreas, raízes e embriões podem ser induzidos a partir de tecidos vegetais que não possuem meristemas pré-existentes. Estes novos órgãos são chamados de adventícios. A criação de uma nova forma e organização, onde antes não existia, é designado organogênese adventícia ou, no caso de formação de embriões, embriogênese somática (GEORGE; HALL; JAN DE KLERK, 2008).

A produção de plantas completas através da regeneração adventícia ocorre a partir de ramos adventícios subseqüentemente enraizados, ou, a partir de embriões somáticos. As partes aéreas, raízes ou embriões somáticos surgem a partir de uma única célula ou grupos de células, as quais são induzidas por reguladores de crescimento presentes no meio de cultura a se tornarem centros ativos de divisão celular (meristema adventício), sendo capaz de produzir órgãos (GEORGE; HALL; JAN DE KLERK, 2008).

Células altamente especializadas de plantas intactas nunca são observadas alterando-se a partir do seu estado diferenciado. Algumas células retêm sua capacidade de dividir, porém, nunca formam órgãos e são consideradas recalcitrantes. De forma similar, algumas células nunca formarão novos órgãos e por isso acredita-se que tenham perdido a capacidade de formar novas plantas. Célula que tenham mantido a capacidade de sofrerem um tipo particular de diferenciação ou regeneração celular, ou que tenham adquirido esta capacidade em resposta a um estímulo apropriado, são ditas competentes (GEORGE; HALL; JAN DE KLERK, 2008).

Competência pode ser definida como um estado em que a célula é capaz de responder a sinais extra-celulares. Uma célula competente que responde a um estímulo externo e fica comprometida a uma via de diferenciação, que inclui a organogênese, é conhecido como determinação. Se as células de um explante não estiverem competentes no momento da excisão, elas poderão ser induzidas a se tornarem competentes *in vitro* expondo-as a uma combinação particular de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. Provavelmente, a adição de outros tipos de reguladores de crescimento serão necessários para induzir a determinação (GEORGE; HALL; JAN DE KLERK, 2008).

Existem dois mecanismos alternativos no qual um explante pode regenerar uma planta: organogênese e embriogênese somática (JIMÉNEZ, 2001). Geralmente, na

organogênese, parte aérea e raiz são formados, seqüencialmente, e em resposta a condições de cultura apropriadas, principalmente o tipo e concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura (JIMÉNEZ, 2001). Este tipo de desenvolvimento é também caracterizado pela presença de conexões entre o tecido matriz e a porção em regeneração (TERZI; LO SCHIAVO, 1990).

Já a embriogênese somática pode ser descrita como um processo através do qual células somáticas haplóides ou diploides se desenvolvem em estruturas semelhantes à embriões zigóticos sem que ocorra a fusão de gametas (RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995). Os embriões somáticos possuem estrutura bipolar e não tem conexão vascular com o tecido parental (RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995). Tem sido registrado que os dois processos, organogênese e embriogênese somática, podem ocorrer num mesmo explante (HE et al., 1990).

Devido a sua importância comercial e seu status de conservação, existe um interesse crescente na propagação vegetativa de bromélias *in vitro*, visto que a multiplicação vegetativa natural pode ser considerada muito lenta e produz poucos brotos por planta (KANASHIRO, 2005). A micropropagação tem sido realizada com sucesso em espécies ornamentais de bromélias por meio do aproveitamento de gemas apicais de brotos, gemas axilares e folhas retiradas de plantas adultas (KANASHIRO, 2005). Pode também ser realizada, através de sementes, considerado de grande importância para a conservação de germoplasmas de bromélias ameaçadas de extinção, assegurando a variabilidade genética natural dessas espécies.

Segundo Mercier e Kerbauy (1997), as bromélias ornamentais estão adquirindo importância econômica em muitos países. A cultura *in vitro* de plantas tem sido considerada uma grande promessa para a agricultura. A utilização comercial da micropropagação é uma realidade em diversos países do mundo com destaque para Europa Ocidental e Estados Unidos, concentrando-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas (MERCIER; KERBAUY, 1997). Entre as inúmeras vantagens da técnica, destaca-se a manutenção de genótipos e fenótipos híbridos, estudo de mutações ou variantes genéticas

selecionadas e o excelente estado fitossanitário das plantas obtidas (GIACOMETTI, 1990).

Mercier e Nievola (2003) descreveram algumas estratégias de multiplicação *in vitro* de bromélias. Concluíram que a germinação de sementes *in vitro* é uma ótima opção para se obter plantas assépticas e, a partir delas, se iniciar uma cultura de explantes como folhas, segmentos nodais, etc. Nos segmentos nodais, cada gema encontrada nas axilas foliares dará origem a um novo eixo caulinar; já o cultivo de folhas inteiras ou de suas bases é realizado utilizando-se meio de cultura acrescido de fitorreguladores, geralmente a citocinina benzilaminopurina (BAP) e a auxina ácido naftalenoacético (ANA), resultando num conjunto de gemas adventícias que se desenvolvem formando novos eixos caulinares. Após o enraizamento em meio indutor apropriado, as novas plantas podem ser transferidas para casa de vegetação ou podem servir como doadoras de novos explantes, continuando o processo de propagação *in vitro*. A uniformidade genética das plantas regeneradas depende do tipo e da concentração de fitorreguladores utilizados, assim como o tipo de explante empregado, ou seja, quanto mais indiferenciado for o tecido doador do explante, menor será o risco de gerar variantes somaclonais.

No caso da bromeliácea mais estudada na cultura *in vitro*, o abacaxizeiro *Ananas comosus*, Pasqual e outros (1998) afirmaram que o meio nutritivo mais utilizado para micropropagação é o meio Murashige e Skooge (MS), suplementado com combinações de auxinas e citocininas, sendo os explantes mais utilizados as gemas laterais e apicais de coroas e filhotes.

### **3.6 Conservação *in vitro* de Germoplasma**

Com a intensa atividade extrativista de espécies florestais nativas, tornou-se importante a aplicação de tecnologias para as práticas conservacionistas como os bancos de germoplasma. Com isso, as coleções de germoplasma passaram a ter papel

fundamental para conservação de espécies ameaçadas de extinção. Bancos de germoplasma são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro, onde não ocorre o descarte de acessos. (VEIGA, 1998). A conservação do germoplasma por meio do cultivo de plantas no seu local de origem é denominada conservação *in situ*. Esta prioriza a proteção do habitat por meio da criação de reservas e unidades de conservação, permitindo assim a evolução contínua das espécies e a manutenção da diversidade intra e inter-específica de populações, indivíduos e genes (POMPELLI; GUERRA, 2004). A conservação *ex situ* de germoplasma se dá pelo cultivo de plantas fora do seu local de origem, em condições de campo ou casa de vegetação.

Os elevados custos de manutenção, os riscos de perda por intempéries, pragas e enfermidades, tornam o banco de germoplasma *ex situ* e *in vitro* um meio bastante atrativo (WITHERS, 1991).

A conservação de plantas *in vitro* consiste no cultivo e renovação das coleções de plantas inteiras ou tecidos em laboratório, utilizando as técnicas de micropropagação (GEORGE, 1993). Para a manutenção dos recursos fitogenéticos é necessário que sejam feitas mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento das células e dos tecidos (ROCA et al., 1991). O objetivo é prolongar o período de cultivo ou estendê-lo indefinidamente. Dessa forma se reduz a mão-de-obra e o espaço necessários, além de proporcionar o fácil acesso a coleção (ROCA et al., 1991; GEORGE, 1993).

No desenvolvimento desse método, dois procedimentos têm sido adotados: o crescimento lento – que envolve a depressão do metabolismo das plantas –, e o da supressão completa do crescimento por armazenamento em temperaturas ultra-baixas, a chamada criopreservação (KARTHA, 1987; PRIMROSE, 1987).

O método do crescimento lento consiste em reduzir o metabolismo da planta, aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plântulas. O crescimento lento tem sido utilizado com sucesso para conservar cultura de gemas de muitas espécies (WITHERS; WILLIAMS, 1990).

Na redução do metabolismo das plantas, têm-se utilizado como estratégia, modificações nas condições físicas (temperatura) ou químicas do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (ROCA et al., 1991). Withers (1991) sugere a redução da temperatura entre 15° e 25°C para culturas de clima tropical quando o objetivo é diminuir o crescimento dos explantes cultivados *in vitro*, e ainda que a redução da temperatura de crescimento devesse ser o primeiro fator limitante a ser testado.

Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos têm sido animadores, e será possível desenvolver um método adequado de crescimento lento para uma nova espécie que exija menos manipulação (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

A baixa temperatura como alternativa para armazenamento *in vitro* de células e órgãos de plantas tem sido aplicada amplamente e com sucesso em kiwi (MONETTE, 1986), maçã, pêra, ameixa e cereja (WILKINS et al., 1988), uva, morango, batata (DODDS; ROBERTS, 1993), beterraba, batata-doce, mandioca, várias forrageiras (SOUZA, 1988), abacaxi (ZEE; MUNEKATA, 1992) e brócolis (KUBOTA et al., 1996).

Uma alternativa freqüentemente usada em combinação com a redução da temperatura é a aplicação de reguladores osmóticos ao meio de cultivo como sorbitol ou manitol Withers (1985). A combinação desses dois procedimentos e a incorporação de inibidores de crescimento ao meio de cultivo são caminhos possíveis para o desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro* em novas espécies.

### **3.7 Meios de cultivo**

Na cultura de tecidos os explantes regeneram-se em condições ambientais assépticas e controladas. Há necessidade de fornecimento de nutrientes de forma balanceada e de fontes de energia essenciais para o desenvolvimento, que, em grande parte, controlam o padrão de crescimento *in vitro* (CALDAS et. al., 1998).

Para cada espécie ou até mesmo ao nível de genótipo, há uma necessidade específica de nutrientes e substâncias essenciais. O meio de cultivo de plantas *in vitro* inclui um agente solidificante, com funções de sustentação das plantas, aeração radicular e o controle osmótico (GAMBORG; PHILLIPS, 1995; TORRES et al, 1998 ).

Nos últimos anos, tem-se utilizado amplamente o cultivo em meio de cultura, por proporcionar melhor desenvolvimento das plantas.

### 3.7.1 Cultivo em meio sólido

Na micropropagação convencional, o meio de cultivo solidificado é o mais utilizado. Ele é composto por água, nutrientes e um agente solidificante que pode ser ágar, phytigel, ou algum derivado de amido, algas ou substâncias sintetizadas para esse fim (DODDS; ROBERTS, 1995; GAMBORG; PHILLIPS, 1995).

As principais características que os agentes solidificantes conferem ao cultivo são:

- a) suporte para o sistema radicular das plantas *in vitro*;
- b) favorece trocas gasosas no sistema radicular, assim como entre o meio de cultivo e o interior do frasco;
- c) regula o potencial osmótico do meio, evitando a vitrificação (órgãos ou tecidos que apresentam aspectos morfológicos e fisiológicos anormais) por excesso de umidade (DODDS; ROBERTS, 1995; GAMBORG; PHILLIPS, 1995). Alguns fatores são limitantes para o cultivo em meio sólido:
  - a) o elevado custo do gel;
  - b) alta demanda por mão-de-obra, devido à elevada frequência de subcultivos;
  - c) formação de um gradiente de nutrientes à medida que o tecido absorve os nutrientes;
  - d) acúmulo de substâncias fitoalelopáticas e de exudados radiculares que podem prejudicar a absorção de nutrientes e o desenvolvimento e crescimento (LEVIN, et al., 1997; CID et al., 2002; TEIXEIRA, 2002).

Plantas e mudas micropropagadas em meio de cultivo sólido têm custo mais elevado devido o preço do agente solidificante e pela limitação da área de cultivo dentro do

frasco. Soma-se a isso a dificuldade de automatizar a substituição do meio nutritivo esgotado para a otimização do processo (KOZAI, 1991a; ZIV, 1995; LEVIN, et al., 1997; CID et al., 2002).

Quanto maior a quantidade de plantas cultivadas por frasco, maior a eficiência econômico-financeira do empreendimento. Enquanto o frasco utilizado com meio de cultivo sólido situa-se ao redor de 500ml, no cultivo em meio líquido, chega-se até 5000ml em escala industrial (LEVIN, et al., 1997; CID et al., 2002; ETTIENE; BERTHOULY, 2002; TEIXEIRA, 2002).

### *3.7.2 Cultivo em meio líquido*

A micropropagação convencional em meio líquido já vem sendo utilizada em diversas espécies como o café e a cana de açúcar (LORENZO et al., 1998), banana (LEVIN, et al., 1997; LEMOS, et al., 2001), abacaxi (ESCALONA, 2003), morango e até mesmo batata (AKITA ; TAKAYAMA, 1988).

No cultivo em meio líquido, o material vegetal pode ficar suspenso sobre ponte de papel filtro ou emerso no meio de cultivo líquido. Quando o material fica emerso, é necessário que se faça a oxigenação do meio de cultivo. Condições de anóxia (ausência de O<sub>2</sub>) ou hipóxia (baixas concentrações de O<sub>2</sub>) estão associadas com a vitrificação ou hiperhidratação dos tecidos (HVOLSLEF – EIDE et al., 2003), tornando o cultivo inviável.

Segundo Aitken– Christie; Davies, (1988) e Ziv (1995), as vantagens dos meios de cultura líquidos, são:

- a) o contato físico entre a planta (explante) e o meio de cultivo é melhorado no caso de emersão;
- b) há uma queda na restrição de trocas gasosas para as raízes;
- c) proporciona um melhor controle da composição do meio e de trocas gasosas;
- d) o crescimento das plantas é mais homogêneo.



Altos rendimentos de microtubérculos de batata são obtidos com a hidroponia *in vitro*, que consiste na tuberização de segmentos nodais dispostos em suporte de algodão e papel filtro, nutrindo o explante com o meio líquido. (NHUT et al, 2006).

#### 4. REFERÊNCIAS

- AITKEN – CHRISTIE, J.; DAVIES, H. E.; Development of a Semi – Automated Micropropagation System. In: High Technology in Protected Cultivation. **Acta Horticulturae**, vol.230, p.81-87, 1988.
- AKITA, M. & TAKAYAMA, S. Mass propagation of Potato Tubers Using Jar Fermentor Techniques. In: High Technology in Protected Cultivation. **Acta Horticulturae**, vol. 230, p.55-61, 1988.
- ANACLETO, A. **Cultivo de bromélias e plantas ornamentais**. EMATER-PARANÁ. Guaratuba. Relatório técnico, p.18, 2001.
- ANDRADE, F.S.A; DEMATTÊ, M.E.S.P. Estudo sobre produção e comercialização de bromélias na região sul e sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.5, n.2, p.97-110, 1999.
- ARAGÃO, M. B. Considerações de hábitat e distribuição geográfica de algumas Bromeliaceae. **Sellowia**, Itajaí, v.19, n.19, p.83-95, 1967.
- ARAGÃO, G. **O mundo das bromélias**. São Paulo, edição 01, janeiro, 1999.
- ARAÚJO, D.S.D. Cabo Frio Region. In: **Davis et al. (eds.) Centers of Plant Diversity**. WWF/IUCN, Oxford, p. 373-375, 1997.
- ARAÚJO, D.S.D.; LIMA, H.C.; FARAG, P.R.C.; LOBÃO, A.Q.; SÁ, C.F.C.; KURTZ, B.C. O Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio: levantamento preliminar da flora. In: **Simpósio de Ecossistemas Brasileiras**, 4, Águas de Lindoia, SP. Anais, v.3, p.147-157, 1998.
- ARAÚJO, A.C., FISCHER, E.A. & SAZIMA, M. As bromélias na região do Rio Verde. In: **Estação Ecológica Juréia-Itatins**. Ambiente físico, flora e fauna (O.A.V. Marques & W. Duleba, eds.). Holos editora, São Paulo, p.162-171, 2004.
- BENNETT, B.C. Patchiness, diversity, and abundance relationships of vascular epiphytes, **Selbyana**, v. 9, p.70-75, 1986.
- BENNETT, B. C, Plants and peoples of the Amazonian rain forests: the role of ethnobotany in sustainable development. **Biociencia**, v. 42, p. 599-607, 1992.
- BENNETT, B.C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZIG, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University, p.690, 2000.
- BENZING, D.H. Bromeliad trichomes: structure, function, and ecological significance. **Selbyana**, v. 1, p.330-348, 1976.
- BENZING, D.H. **The biology of bromeliads**. California: Mad River, p. 305, 1980.
- BENZING, D.H. **Vascular Epiphytes**. New York: Cambridge University Press, p .354, 1990.
- BENZING, D.H. Vascular Epiphytes in Forest Canopies. In: **Lowman, M.D.; Nadkarni, N. M. (Eds.). Forest Canopies**. New York: Academic Press, p.225-254, 1995.

BENZING, D.H. **Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation**. Cambridge University Press. New York, p. 690, 2000.

BONNET, A. **Caracterização fitossociológica das bromeliáceas epifíticas e suas relações com os fatores geomorfológicos e pedológicos da planície do Rio Iguaçu, Paraná, Brasil**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2006.

BRANDIES, M. M. **Landscaping with tropical plants**. Menlo Park (CA): Sunset, p.128, 2004.

BRASIL. IBAMA. **Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção**. Portaria Nº 37-N, de 3 de abril de 1992.

BRÜCHER, H. Usefull plants of neotropical origin and their wild relatives. New York: **Springer-Verlag**, 1989.

BSI- **Bromeliad Society International**. What are Bromeliads. Disponível em: <http://bsi.org/> Acesso em: 20 fev. 2008.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios de Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (EDS.) 1998. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. **Embrapa**. Vol.1, p.87 – 132, 1998.

CATHCART, D. J. The importance of maintaining bromeliad imports. **Florida Entomologist**, v. 78, n. 1, p. 19-21, 1995.

CID, L. P. B.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. Biorreatores de Imersão Permanente. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**. Ano 4, n.25 Março- Abril/2002. p. 50-53, 2002.

COFFANI-NUNES, J. V. Estudos florísticos e fenomorfológicos de Tillandsioideae (Bromeliaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais. **Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)** – Universidade de São Paulo, p.129, 1997.

COFFANI NUNES, J.V. Bromélias. In: **SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. SENAC, São Paulo, Brasil, p. 119-132, 2002.

COSTA, A.; FONTOURA, T. Bromélias do Rio de Janeiro. **Ciência Hoje**, n.9, p. 8-9, 1989.

COXSON, D.S. e NADKARNI, N.M. Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest ecosystem. In: **M.D. Lowman & N.M. Nadkarni (eds.). Forest Canopies**. London, Academic Press, p. 495-543, 1995.

DEJEAN, A.; OLMSTED, I. Ecological studies on *Aechmea bracteata* (swartz) (Bromeliaceae). **J. Nat. Hist**, n.31, p.1313-1334, 1997.

DESJARDINS, Y. Photosynthesis in vitro – On the Factors Regulating CO<sub>2</sub> Assimilation in Micropropagation Systems. In: Environmental Control in Planta Tissue Culture. **Acta Horticulturae**, Vol.393, p. 45-61, 1995.

DIAS, S. C.; BRESOVIT, A. D. Microhabitat selection and co-occurrence of *Pachistopelma rufonigrum* Pocock (Araneae, Theraphosidae) and *Nothroctenus fuxico*

- sp. Nov. (Araneae, Ctenidae) in tank bromeliads of Serra de Itabaiana, Sergipe, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 21, n. 4, p. 789-796, 2004.
- DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2. ed. Cambridge, Estados Unidos: Cambridge University Press, p.172-179, 1993.
- ESCALONA, M., SAMSON, G.; BORROTO, C.; DESJARDINS, Y. Physiology of Effects of Temporary Immersion Bioreactors on Micropropagated Pineapple Plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, vol.39, p. 651-656, 2003.
- ETIENNE, H. & BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** Vol.69, p. 215–231, 2002.
- FEVEREIRO, P.M.; CAETANO, V.H.; SANTOS, G.M. **Cadernos didáticos de Ciências**, vol 1. Lisboa: Ministério da Educação, DES, EEC, 2001.
- FISCHER, E.A e ARAUJO, A.C. Spatial organization of a bromeliad community in the Atlantic rainforest, southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology** 11: p.559-567, 1995.
- FLORIANO, E. P. **Produção de mudas florestais por via assexuada**, Caderno Didático n. 3, 1ª ed., 2004.
- FREIMAN, L. O.; SABAA SRUR, A. U. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*, (L.) Merrill). **Ciência e Tecnologias de Alimentos**, v. 19, p.170-173, 1999.
- FUJIWARA, K.; KIRA, S. & KOZAI, T. Contribution of photosynthesis to dry weight increase of in vitro potato cultures under different CO<sub>2</sub> concentrations. In: Environmental Control in Plant Tissue Culture. **Acta Horticulturae**, Vol. 393, p.119- 126, 1995.
- GALETTO, L. e BERNARDELLO, L.M. Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae: structure and nectar composition. **Canadian Journal of Botany** 70: 1101- 1106, 1992.
- GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G.C. (eds) Fundamental Methods. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** –Springer Lab Manual. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, German, p. 359,1995.
- GENTRY, A.H.; DODSON, C.H. Diversity and Biogeography of Neotropical Vascular Epiphytes. **Annals Missouri Botanical Garden**, v.74, p.205-233, 1987.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. London: Exegetics, v.1, 1993.
- GEORGE, F. E.; HALL, A. M.; JAN DE KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3 ed. V. 1, Springer, p.360, 2008.
- GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: **TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, p. 19-28, 1990.
- HADEL, V. F. **A fauna associada aos fitotelmata bromelícolas da Estação Ecológica da Juréia** – Itatins (SP), 1998.

HE, D.G.; YANG, Y.M.; BERTRAM, J.; SCOTT, K.J. The histological development of the regenerative tissue derived from cultured immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Science**, 68:103-111, 1990.

HERRERA, R.; JORDAN, C.F.; KLINGE, H. e MEDINA, E. Amazon ecosystems. Their structure and functioning with particular emphasis on nutrients. **Interciencia** 3(4): 223-231, 1978.

HIETZ, P.; HIETZ-SEIFERT, U. Composition and ecology of vascular epiphyte communities along an altitudinal gradient in central Veracruz, México. **Journal of Vegetation Science**, v.6, p.487-498. 1995.

HVOSLEF-EIDE, A. K.; MUNSTER, C.; HEYERDAHL, P. H.; LYNGVED, R.; OLSEN, O. A. S. Liquid Culture Systems for Plant Propagation. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; SAXENA, P. (Eds) Proc. XXVI IHC – Biotechnology in Hort. Crop Improvement. **Acta Horticulturae**, Vol. 625, p.173- 185, 2003.

IBAMA – **Instituto Brasileiro de Meio Ambiente**. Xaxim. Disponível em: [http://www2.ibama.gov.br/flora/sobre\\_flora.htm](http://www2.ibama.gov.br/flora/sobre_flora.htm). Acesso em: 3 jul. 2007.

JIMENEZ, M.V. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, vol.13, no.2, p.196-223. ISSN 0103-3131, 2001.

JORDAN, C.F. Nutrient cycling processes and tropical forest management. Pp. 159-180. In: A. Gómez-Pompa; T.C. Whitmore & M. Hadley (eds.). **Rain forest regeneration and management**. Pub. UNESCO & The Parthenon Publ. Group. Man and the Biosphere series v.6. Paris, 1991.

JORDAN, C.F.; HERRERA, R. e MEDINA, E. Nutrient scavenging of rainfall by the canopy of an Amazonian rain forest. **Biotropica** 12(1): 61-66, 1980.

KAEHLER, M.; VARASSIN, I.; GOLDENBERG, R. Polinização em uma comunidade de bromélias em Floresta Atlântica Alto-montana no Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, V.28, n.2, p.219-228, abr.-jun. 2005.

KALIFE, C. Contribuição ao conhecimento da anatomia ecológica de folhas de *Aechmea ornata* Baker e *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). **Dissertação** (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (BAKER) L.B. SMITH in vitro**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2005.

KARTHA, K. K. Advances in the cryopreservation technology of plant cells and organs. In: ALLEN, N. S. (Ed.). **Plant biology**. New York: Alan R. Liss,. v. 3, p. 447-458, 1987.

KISS, J. Ameaçadas de extinção, bromélias ganham nova vida nas estufas. **Globo Rural**.n.193, Nov/2001. Disponível em: [Http://globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/193/rep\\_bromeliaa.htm](Http://globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/193/rep_bromeliaa.htm) 10-jul-05. Acesso em 29 nov. 2007.

- KITAYA, Y.; SAKAMI, K. & KOZAI, T. Development of photoautotrophic Plant Tissue Culture System Using CO<sub>2</sub> from Shiitake Mushroom. *Environmental Control in Plant Tissue Culture*. **Acta Horticulturae**, Vol. 393.. p. 195-202, 1995.
- KLEIN, R.M. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção - Estado de Santa Catarina: mirtáceas e bromeliáceas**. IBGE, v.1, 283p, 1990.
- KOZAI, T. Acclimatization of Micropropagated Plants. In: Bajaj, Y.P.S. (ED.), **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Vol 17. High- Tech and Micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 127-141, 1991a.
- KOZAI, T. Autotrophic Micropropagation. In: Bajaj, Y.P.S (ED). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Vol. 17 High-Tech and Micropropagation I. Springer-verlag Berlin Heidelberg. p. 313-343, 1991b.
- KRESS, W.J. The systematic distribution of vascular epiphytes: an update. **Selbyana**, v.9, p.2-22, 1986.
- KUBOTA, C.; RAJAPAKSE, N. C.; YOUNG, R. E. Low-temperature storage of micropropagated plantlets under selected light environments. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 3, p. 449-452, 1996.
- LAESSLE, A. M. A microlimnological studies of Jamaican bromeliads. **Ecology**, v. 42, p. 499-517, 1961.
- LEME, E.M.C. Bromélias. **Ciência Hoje**, v.3, n.14, p.66-72. 1984.
- LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélias na natureza**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual, 1993.
- LEME, E. M. C. Canistrum. **Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Salamandra, p.108, 1998.
- LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de Clone de Banana CV. Terra em Sistema de Biorreator de Imersão Temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, Dezembro Vol. 23, n.3, p. 482-487, 2001.
- LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R. & WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropropagation. In: Hort. Biotech. In Vitro Cult. And Breeding. **Acta Horticulturae**, Vol. 447, p. 659-663, 1997.
- LORENZO, J.C.; GONZALES, B; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C.G. Sugar cane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, n.3, p.197-200, 1998.
- LOWMAN, M.D.; NADKARNI, N.M. **Forest Canopies**. London, Academic Press, 1995.
- MABBERLEY, D. J. **The plant book**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
- MALAUURIE, B.; TROUSLOT, M. F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J. Medium-term and long-term in vitro conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, Chile, v. 1, n. 3. Disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/3/index.html>. Acesso em: 15 dez., 1998.

- MARTINELLI, G. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: **Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Mata Atlântica. (H.C. Lima & R.R. Guedes-Bruni, eds.)**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.213-250, 1997.
- MEDINA, E.; TROUGHTON, J.H. Dark CO<sub>2</sub> fixation and the carbon isotopo ratio in Bromeliaceae. **Plant Science Letters** **2**, p.357-362, 1974.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Microproagation of ornamental bromeliads. In: **Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry - Serie High-Tech and Microproagation**. Volume 40, Springer-Verlag, New York, p. 43-57, 1997.
- MERCIER, H.; NIEVOLA C.C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidália**, v.1, n.1, p.57-62, 2003.
- MONETTE, P. L. Cold storage kiwifruit shoot tips in vitro. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1203-1205, 1986.
- MYERS, N.; MITTERMEYER, R.A.; MITTERMEYER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- NAHOUM, P. Bromélia. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, v.1, p. 1-40,1994.
- NEGRELLE, R. R. B.; ANACLETO, A.; MITCHELL, D. Local production and global markets: lessons from southern Brazil. In: **“A Future Beneath the Trees” International Symposium Proceedings**, , Victoria (BC, Canada), 2005.
- NIU, G.; KOZAI, T. & MIKAMI, H. Simulation of the effects of Photoperiod and Light Intensity on the growth of Potato Plantlets Cultured Photoautotrophically in Vitro. In: Plant Production in Closed Ecosystems. **Acta Horticulturae**, Vol. 440, p. 622-627, 1996.
- NHUT, D.T.; NGUYEN, N.H.; THUY, D.T.T. A Novel In Vitro Hydroponic System for Potato (*Solanum tuberosum* L.) Microtuber Production. **Science Horticulturae**. Vol. 110 p. 230-234, 2006.
- NUNES, J.V.C. Bromélias. In: **SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (eds). Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**, São Paulo: SENAC, p.119-132, 2002.
- OLIVEIRA, R.R.; COELHO NETTO, A.L. Captura de nutrientes atmosféricos pela vegetação na Ilha Grande, RJ. **Pesquisa Botânica** **51**: p.31-49, 2001.
- POMPELLI, M. F. Morfogênese *in vitro*, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachya* Hassler. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 2002.
- POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, n°4, p.273-279, 2004.
- PRIMROSE, S. B. **Modern biotechnology**. Oxford: Blackwell Scientific, p.176, 1987.

PUGA, N.T.; NASS, L.L.; AZEVEDO, J.L. **Glossário de Biotecologia Vegetal**, Ed. Manole Ltda. São Paulo, 82p., 1991.

RAEMAKERS, C.J.J.M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, n.81, p.93-107, 1995.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

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**, v. 14, p. 1799-1808, 2005.

REILLY, B. The Bromeliad Society of Queensland. Fortitude Valley Queensland, Australia 4006, **VOLUME XL - No. 5 - SEPTEMBER/OCTOBER 2006**. Disponível em: [www.bromsqueensland.com](http://www.bromsqueensland.com). Acesso em: fevereiro de 2008.

REITZ, R. Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. Fl. Ilustr. Catarinense, Parte. **Fasc. Brom.**, p. 518, 1983.

RIZZINI, C.T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Rio de Janeiro. 2ª ed. Âmbito Cultural Edições Ltda. p.747, 1997.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. In: **ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p.697-712, 1991.

ROCHA, C.F.D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; ALMEIDA, D.R. e FREITAS, A.F.N. Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. **Bromelia** v. 4, p. 7-10, 1997.

ROCHA, C.F.D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; NUNES-FREITAS, A.F.; ROCHA PESSOA, T.C.; DIAS, A.S.; ARIANI, C.V.; MORGADO, L.N. Conservando uma larga proporção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, v.2, n.1, p.52-68, 2004.

RUNDEL, P.W.; DILLON, M.O. Ecological patterns in the *Bromeliaceae* of the lomas formations of Coastal Chile and Peru. **Plant System Evolution** 212: p.261-278, 1998.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Polinização de *Vriesea* por morcegos no sudeste brasileiro. **Bromélia** 2: p.29-37, 1995.

SAZIMA, I.; BUZATO, S.; SAZIMA, M. An assemblage of hummingbird – pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. **Botanica Acta** 109: p.149-160, 1996.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest Sites in Brazil. **Annals of Botany** 83: p.705-712, 1999.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Polinização por beija-flores em *Nidularium* e gêneros relacionados. In: **Leme E.M.C. Nidularium: Bromélias da Mata Atlântica**. Sextante Artes, Rio de Janeiro, p.190-195, 2000.



SBB - **SOCIEDADE BRASILEIRA DE BROMÉLIAS-SBB**. Bromélias e a natureza. Disponível em <http://www.bromelia.org.br>. Acesso em: 13 abril 2008.

SCHOELLHORN, R. **Bromeliads: long-lasting tropical color**. Disponível em: <http://hort.ifas.ufl.edu/floriculture/gpn/bromeliads.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2008.

SEMA/SP. Resolução SMA 48. **Lista oficial das espécies da flora do Estado de São Paulo ameaçadas de extinção**. 2004. Disponível em: [http://www.ibot.sp.gov.br/resolucao\\_sma48/txt\\_resolucao48.htm](http://www.ibot.sp.gov.br/resolucao_sma48/txt_resolucao48.htm). Acesso em: 10 maio 2008.

SIQUEIRA FILHO, J.A. Biologia floral de *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez. **Bromélia** 5: p.1-13, 1998.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. *Pitcairnoideae*. (Bromeliaceae). **Fl. Neotrop. Monogr.**, 14 (1): 1-658. The New York Botanical Garden, New York, 1974.

SOUZA, E. L. S. Conservação de germoplasma in vitro. In: ARAÚJO, S. M. C.; OSUNA, J. A. (Ed.). **In: Encontro sobre Recursos Genéticos**, 1988, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Unesp, p.96-101, 1988.

STEENS, A. **Bromeliads for the contemporary gardens**. Protland: Timber, p.198, 2003.

SUDGEN, A.M. Aspects of the ecology of vascular epiphytes in two Colombian cloud forests. II. Habitat preferences of Bromeliaceae in the Serrania de Macuira. **Selbyana**, v.5, n.3/4, p.264-273, 1981.

TEIXEIRA, J.B.; SONDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.34, 1993.

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**. Ano 4, n.24 p. 36-41, 2002.

TERZI, M.; LO SCHIAVO, F. Somatic embryogenesis. In: **BHAJWANI, S.S. (Ed.) Plant Tissue Culture: Applications and Limitations**. Amsterdam, Elsevier. p. 54-66, 1990.

TICKTIN, T.; JOHNS, T.; CHAPOL XOCA, V. Patterns of growth in *Aechmea magdalenae* (Bromeliaceae) and its potential as a forest crop and conservation strategy. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 94, p. 123–139, 2003.

TICKTIN, T. e NANTEL, P. Dynamics of harvested populations of the tropical understory herb *Aechmea magdalenae* in old-growth versus secondary forests. **Biological Conservation**, v. 120, p.461–470, 2004.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, EMBRAPA-CNPq, Vol.1, p. 509, 1998.

VARADARAJAN, G.S.; BROWN, G.K. Morphological variation of some floral features of the subfamily Pitcairnoideae (Bromeliaceae) and their significance in pollination biology. **Botanical Gazette** 149: p.82-91, 1988.

VARASSIN, I.G.; SAZIMA, M. Recursos de Bromeliaceae utilizados por beija-flores e borboletas em Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, nova série 11/12: p.57-70, 2000.

- VOGEL, S. Chriptrophilie in der neotropischen Flora. Neue Mitteilungen III. **Flora** 148: p.289-323, 1969.
- WHEELER, W.M. A new case of parabiosis and the "ant gardens" of British Guiana. **Ecology**, v.2, p. 89-103, 1921.
- WILKINS, C. P.; NEWBURY, H. J.; DODDS, J. H. Tissue culture conservation of fruit trees. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 1, n. 73/74, p.9-20, 1988.
- WITHERS, L. A. Cryopreservation and storage of germplasm. In: **DIXON, R. A. (Ed.). Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: Irl Press, p. 69-191, 1985.
- WITHERS, L. A. In vitro conservation. In: **HAWKES, J. G. (Ed.). Genetic conservation of world crop plants**. San Diego: Academic, p.31-42, 1991.
- WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: **Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v.1, p.297-330, 1998.
- WITTMAN, P. K. The animal community associated with canopy bromeliads of the Lowland Peruvian Amazon Rain Forest. **Selbyan**, v. 21, n.1-2, p. 48-51, 2000.
- ZEE, F. T.; MUNEKATA, M. In vitro storage of pineapple (*Ananas spp.*) germplasm. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 1, p.57-58, 1992.
- ZIV, M. The Control of Bioreactor environment for plant Propagation in Liquid Culture. In: Environmental Control in Plant Tissue Culture. **Acta Hort**. Vol.393, p.25- 38, 1995.
- ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F. & KOZAI, T. Quality Biomass Production Via Photoautotrophic Micropropagation. **Acta Hort**. Vol.530, p. 377-386, 2000.

**5. Capítulo 1 – Germinação *in vitro* de sementes de *Vriesea sucrei***

## 5.1 INTRODUÇÃO

São muitos os fatores que contribuem para a drástica redução do número de espécies de bromélias na natureza, tornando-as raras e ameaçadas de extinção. Dentre eles podem ser citadas a devastação da Floresta Atlântica, um bioma onde há grande ocorrência de espécies endêmicas, a exploração predatória de espécies com potencial ornamental como é o caso da *Vriesea sucrei*, espécie abordada neste trabalho, *Aechmea fasciata* (ZIMMER; PIEPER, 1976), *Aechmea fulgens* (PIERIK; SPRENKELS, 1989), *Cryptanthus bromelioides* var. *tricolor* (MATTHEWS; RAO, 1982), and *Tillandsia cyanea* (PIERIK; SPRENKELS, 1991), *Vriesea fosteriana*, e *Vriesea hieroglyphica* (MERCIER; KERBAUY, 1995), dentre outras. Somado aos fatores antrópicos, existem algumas características fisiológicas como o lento crescimento e maturação, baixa viabilidade das sementes e baixas taxas de germinação no ambiente natural que contribuíram para a redução das populações naturais (PICKENS et al., 2005).

A reprodução, a dispersão e a sobrevivência do germoplasma contribuem para a permanência das espécies em seus habitats (FENNER, 1985). Quando se deseja iniciar um banco de germoplasma ou a propagação de espécies raras ou ameaçadas de extinção, a micropropagação deve ser iniciada através de sementes germinadas assepticamente, devido à restrição do número de plantas-matrizes na natureza (MERCIER; NIEVOLA, 2003).

O extenso período de florescimento associado à maturação desuniforme dos frutos das bromeliáceas são alguns fatores que devem ser considerados quando se deseja coletar frutos para fins de propagação (DUARTE et al., [2000?]). Um bom indicador de campo para a colheita das sementes tem sido a mudança de coloração dos frutos e, na maioria das vezes, esses frutos são colhidos secos para facilitar o preparo das sementes e posterior armazenamento (DUARTE et al., [2000?]).

Durante o ciclo vital, de acordo com a espécie e/ou condições ambientais, a planta floresce e frutifica somente uma vez. Porém, uma vez coletadas as sementes, consegue-se em curto espaço de tempo, com a germinação *in vitro*, grande quantidade de mudas, sendo a taxa de multiplicação muito superior à obtida *in vivo*.

A micropropagação a partir de sementes permite obter plantas com diversidade genética (ROGERS, 1984) e sem alterações morfológicas e fisiológicas como a variação somaclonal (GIACOMETTI, 1990). Essas características são excelentes na etapa de aclimatização e transferência para vasos ou para as matas de origem (MERCIER; KERBAUY, 1997). Já foi obtida com sucesso a germinação *in vitro* de várias espécies de bromélias tropicais, como *Vriesea splendens* (MEKER, 1977), *V. hieroglyphica* (MERCIER; KERBAUY, 1994), *V. gigantea* e *Vriesea philippocoburgii* (DROSTE et al., 2005), *V. fosteriana* (MERCIER; KERBAUY, 1992), dentre muitas outras.

A germinação *in vitro* dessas espécies consiste numa estratégia capaz de produzir plantas saudáveis com diversidade genética que poderão ser reintroduzidas na mata, utilizadas como plantas matrizes para a micropropagação clonal, ou mantidas em bancos de germoplasma *in vitro* ou *in vivo*.

## **5.2 OBJETIVO**

Compor o banco de germoplasma experimental *in vitro* e *ex situ* do setor de botânica da UFES com plantas sadias de *V. sucrei* obtidas por germinação *in vitro* utilizando meios de cultura e substratos adequados.

### 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Bromélias da espécie *Vriesea sucrei* provenientes do Instituto Kautsky, localizado na região serrana do Espírito Santo no Município de Domingos Martins, serviram de matrizes para o fornecimento de cápsulas contendo sementes a serem empregadas nas técnicas de cultura de tecidos vegetais. As cápsulas foram trazidas ao laboratório de Fisiologia Vegetal do Setor de Botânica da UFES em maio de 2007, onde foram acondicionadas em frascos de vidro e sob baixa temperatura (+/- 5°C) até o momento dos testes de germinação, cinco meses após a coleta.

As cápsulas sofreram um processo de desinfestação com solução de etanol 70% (v/v) por 5 min, transferidas para solução de hipoclorito de sódio 2% (p/v) de cloro ativo por um período de 30 min e enxaguadas quatro vezes com água destilada autoclavada, sob câmara de fluxo laminar, conforme metodologia descrita por Mercier e Nievola (2003).

No dia da inoculação, as sementes foram retiradas manualmente das cápsulas e tiveram seu apêndice plumoso cortado. Em câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por um processo de desinfestação com solução de etanol 70% (v/v) por 3 min, uma lavagem com água destilada autoclavada, transferidas para solução de hipoclorito de sódio 2% (p/v) de cloro ativo por 30 min., enxaguadas quatro vezes com água destilada autoclavada e inoculadas em meios de cultura e substratos *in vitro*.

Foram testados sete diferentes meios de germinação:

- (1) Controle (papel de filtro umedecido com água destilada);
- (2) Meio nutritivo Murashige e Skooge (1962) (MS) gelificado com ágar e acrescido de vitaminas de Gallo (1974) (Anexo 1);
- (3) Meio nutritivo MS líquido acrescido de vitaminas de Gallo (1974) (Anexo 1);
- (4) Meio nutritivo Knudson (1946) (K) gelificado com ágar (Anexo 2);
- (5) Meio nutritivo K líquido (Anexo 2);
- (6) Areia lavada autoclavada;
- (7) fibra de coco autoclavada.

Os meios MS gelificado e liquido e K gelificado e liquido foram acrescidos de 30 e 20 g/L de sacarose respectivamente, sem adição de reguladores de crescimento conforme sugestões de Mercier e Nievola (2003).

Foram adicionados a cada placa de petri 20 mL de meio de cultura, ou 20 mL de água destilada, ou 55g do substrato areia ou 2g de fibra de coco.

Os tratamentos consistiram de quatro replicatas contendo 25 sementes por placa totalizando 100 sementes por tratamento.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, conforme sugestões de Droste e outros (2005). Todo o material de trabalho, incluindo água destilada, bisturis, pinças e outros instrumentos e vidrarias foram esterilizados em autoclave à 120°C, 1atm por 20 minutos.

As sementes inoculadas *in vitro* foram acondicionadas em salas de crescimento com temperatura ajustada para 25°C ( $\pm 2$ ), radiação de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de luz constante.

Foram feitas contagens diárias de sementes germinadas a partir do dia do início da germinação a fim de calcular o Índice de Velocidade de Germinação (IVG). O IVG foi calculado pela fórmula de Maguire (1962):

$V_g = N_1/D_1 + N_2/D_2 + \dots + N_n/D_n$ , onde

$N_1$  = número de plântulas normais, no primeiro dia de contagem;

$D_1$  = número de dias transcorridos, desde a instalação do teste até o primeiro dia de contagem;

$N_2$  = número de plântulas normais, entre o primeiro e o segundo dias de contagem;

$D_2$  = número de dias transcorridos, desde a instalação do teste até o segundo dia de contagem;

$N_n$  = número de plântulas normais, entre o penúltimo e o último dia de contagem;

$D_n$  = número de dias transcorridos, desde a instalação do teste até o último dia de contagem.

As contagens de plântulas germinadas foram encerradas quando as porcentagens de germinação se tornaram constantes por um período de cinco dias.



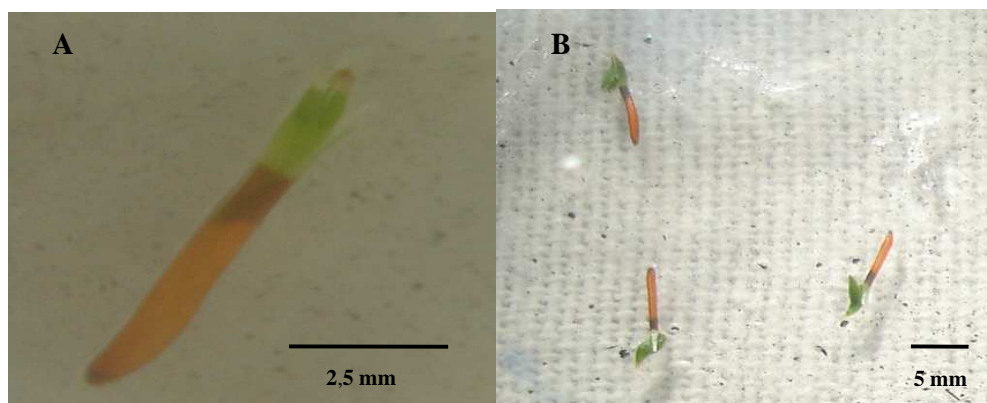
Após 120 dias de cultivo, foram calculadas a porcentagem de germinação e de sobrevivência das plântulas germinadas. A protrusão da parte aérea foi o critério utilizado como indicativo da germinação. Plântulas normais com no mínimo 2 folhas emitidas foi o critério utilizado como indicativo de sobrevivência das mesmas.

Foram realizadas medidas de crescimento como n° de folhas e altura da parte aérea das plântulas obtida pela germinação *in vitro*, para avaliar qual tratamento promoveu maior crescimento inicial.

O experimento foi inteiramente casualizado. Os valores percentuais da germinação de sementes e de sobrevivência das plântulas foram transformados em arco seno  $\sqrt{p}$  e analisados pela variância dos dados (ANOVA), seguida do teste de Tukey (SNEDECOR; COCHRAN, 1967) a 5% de probabilidade. As medidas de crescimento em altura e número de folhas e o IVG também foram analisados pela variância dos dados (ANOVA), seguido do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *Vriesea sucrei* começaram a germinar depois de cinco dias em todos os tratamentos testados (Figura 5A), e se estendeu até o 12º dia após a inoculação. A germinação resultou no aparecimento de uma plântula por semente (Figura 5B). Todos os tratamentos apresentaram altas taxas de germinação (entre 97 a 100%), não havendo diferença significativa entre eles (Tabela 3). Estes resultados sugerem que o armazenamento das cápsulas contendo sementes em torno de 5°C, foi eficaz devido a alta germinabilidade das mesmas. Como consequência, um grande número de cápsulas podem ser coletadas e armazenadas mesmo quando um período maior de tempo for necessário para processar e inocular todo o material em meio de cultura. Droste e outros (2005) também alcançaram altas taxas de germinação para *Vriesea gigantea* (entre 92 e 96%) após o armazenamento das sementes a 4°C durante 21 dias. No presente trabalho, o tratamento controle atingiu 100% de germinação (Tabela 3). Sendo assim, por razões práticas e econômicas, este seria o meio mais indicado para a germinação de sementes de *V. sucrei*.



**Figura 5-** As figuras mostram o processo de germinação de sementes de *V. sucrei*. (A) protrusão da parte aérea cinco dias após a inoculação nos tratamentos; (B) 40 dias após a inoculação nos tratamentos.

As porcentagens de germinação alcançadas por *V. sucrei* foram semelhantes a outras espécies do gênero *Vriesea* documentadas na literatura. Mercier e Kerbauy (1994) registraram até 90% de germinação para *V. hieroglyphica* utilizando os meios  $\frac{1}{2}$  K e  $\frac{1}{4}$  K.

Para *V. splendens*, Merkers (1976) observou boa germinação das sementes em meio K e MS gelificados. No entanto, as sementes de *V. splendens* germinadas no meio MS gelificado resultaram em plântulas que morreram após algumas semanas. O autor atribuiu este resultado a alta sensibilidade da espécie a elevada concentração de sais presentes no meio MS, pois ao utilizar meio MS contendo apenas  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$  da concentração normal de sais, Merkers (1976) obteve uma maior porcentagem de sobrevivência das plântulas.

Estes resultados são semelhantes aqueles obtidos para *V. sucrei*, cuja porcentagem de germinação foi satisfatória nos meios gelificados K e MS e, no entanto, não resultaram em plântulas normais sobreviventes após 120 dias em cultura (Figura 6). É possível que o agar tenha sido o responsável pela morte das plântulas de *V. sucrei* nos tratamentos MS Agar e K Agar, por este ter limitado a absorção de água pelas plântulas. A concentração de sais dos meios K agar e MS agar não afetou a germinabilidade e sobrevivência das plântulas, pois os meios MS líquido e K líquido mostraram 91% e 95% de sobrevivência, respectivamente (Tabela 3). Os demais tratamentos apresentaram altas taxas de sobrevivência (Tabela 3). Portanto, estes resultados sugerem que não seria aconselhável a germinação e crescimento inicial de plântulas da espécie *V. sucrei* em meios de cultura gelificados com agar.

Para germinação das sementes de *Vriesea reitzii*, Alves, Dal Vesco e Guerra (2006) utilizaram meio MS gelificado e obtiveram plântulas de até 1,5 cm após 60 dias em cultura a 25°C e fotoperíodo de 16 h luz.

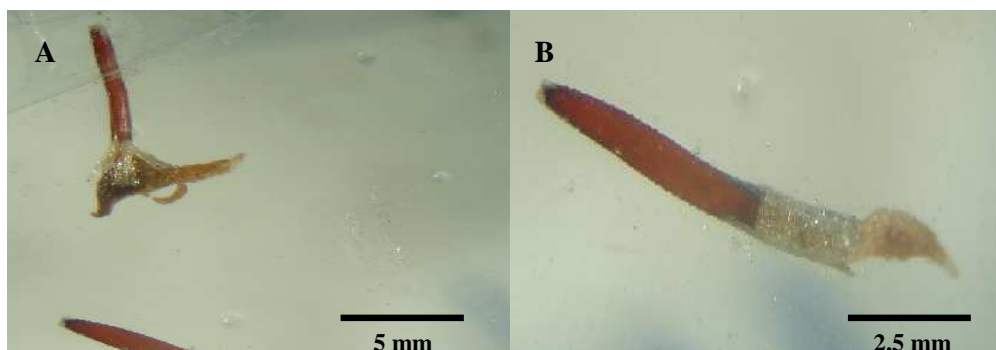
Sementes de *Tillandsia eizii* foram germinadas em meio K gelificado e deram origem a plântulas com 7 mm de comprimento após 90 dias em cultura. Na literatura existem diferentes relatos sobre o meio de cultura ideal para a germinação de bromélias, variando de acordo com a espécie estudada. Não há um meio de cultura ou substrato que seja um consenso para a germinação de sementes e crescimento inicial *in vitro* de

bromélias do gênero *Vriesea*. Por isso, são importantes e necessários os estudos acerca das condições ideais para cada espécie.

Os valores de IVG foram altos em todos os tratamentos testados (valores próximos ao valor máximo 5). No entanto, os valores de IVG foram significativamente diferentes entre os tratamentos. Os meios de cultura gelificados e o substrato fibra de coco apresentaram menores valores de IVG em relação aos demais tratamentos (Tabela 3), indicando que os meios K líquido, MS líquido, areia e controle promovem uma germinação mais rápida.

**Tabela 3-** Características germinativas de sementes de *Vriesea sucrei* nos tratamentos areia, fibra de coco, Murashige e Skooge gelificado, Knudson gelificado, MS líquido, K líquido e controle. Porcentagem de germinação, Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e porcentagem de sobrevivência. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

	<b>Germinação (%)</b>	<b>IVG (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>Sobrevivência (%)</b>
<b>Areia</b>	100 a	4,5155 a	94 a
<b>Fibra Coco</b>	97 a	4,0595 b	82 a
<b>MS gelificado</b>	99 a	4,1484 b	0 b
<b>K gelificado</b>	98 a	4,1904 b	0 b
<b>MS líquido</b>	100 a	4,5099 a	91 a
<b>K líquido</b>	100 a	4,5122 a	95 a
<b>Controle</b>	100 a	4,5199 a	93 a



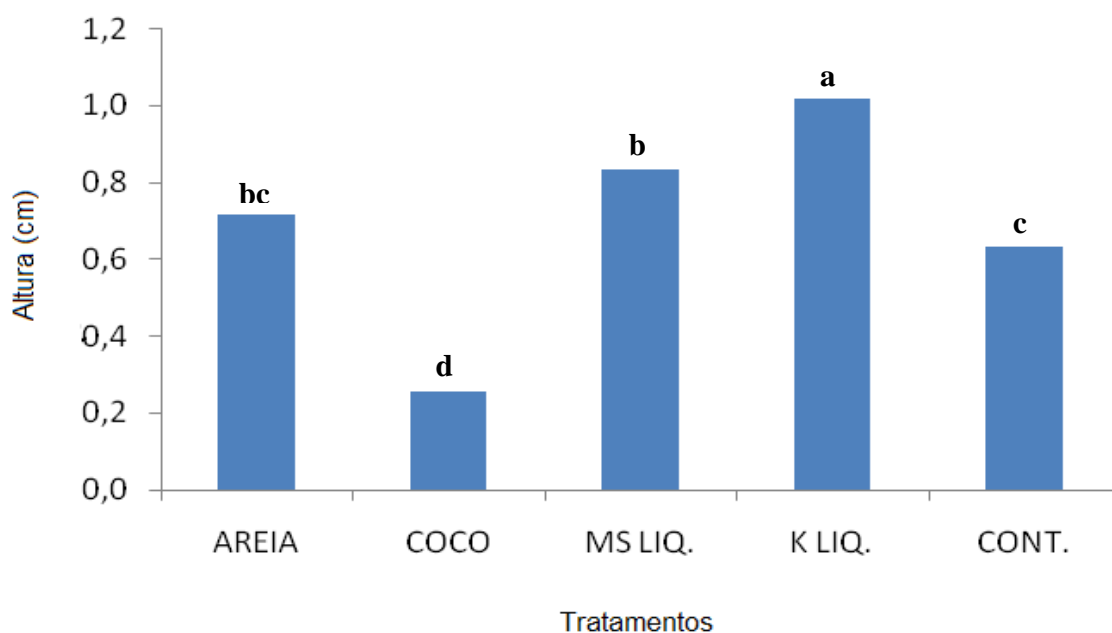
**Figura 6** - Plântulas não sobreviventes de *V. sucrei* 120 dias após a inoculação no tratamento (A) MS gelificado; (B) K gelificado.

A fibra de coco vem se afirmando como uma alternativa para a produção de substratos por ser um substrato de fácil obtenção, baixo custo, resíduo da exploração comercial da água de coco e existente em abundância. Suas potencialidades de uso na composição de substrato agrícola têm sido abordadas (CARRIJO et al., 2002; MEEROW, 1997) destacando-se: a capacidade de retenção de água; boa drenagem; acidez; alta salinidade – decorrente, sobretudo, dos altos teores de potássio e cloro; e variação nos teores de nutrientes (HANDRECK, 1993; EVANS et al., 1996; KONDURU; ABAD et al., 2002). A fibra de coco pura ou em mistura tem sido utilizada com sucesso no cultivo de bromélias como *Aechmea fasciata* e *Tillandsia gardneri* (D'ANDRÉA; DEMATTÊ, 2000; DEMATTÊ; OSHIRO, 2001). No entanto, a fibra de coco não obteve resultados satisfatórios para *V. sucrei* quanto ao crescimento inicial.

A figura 7 mostra os resultados do crescimento inicial em altura das plântulas de *V. sucrei* germinadas in vitro. A fibra de coco resultou em plântulas muito pequenas (0,2 cm de altura em média) se destacando em relação aos demais tratamentos (Figura 7). Possivelmente, a alta concentração de sais (principalmente o NaCl) pode ter inibido o desenvolvimento das plântulas.

O meio Knudson líquido (K líq.) apresentou os maiores valores para o crescimento em altura das plântulas, cuja média foi de 1,0 cm; seguido pelo meio Murashige e Skooge líquido (MS líq.) com 0,8 cm de altura, o substrato areia com 0,7 cm e o controle com 0,6 cm. Com base nestes dados, é possível que a presença dos macro e

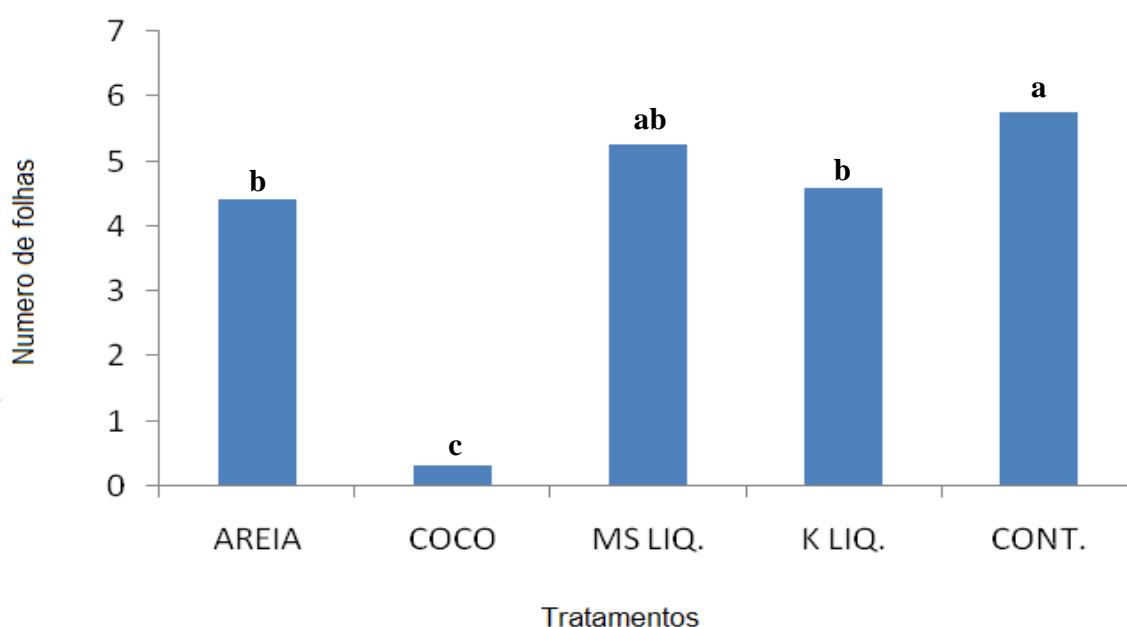
micronutrientes no meio nutritivo tenha influenciado positivamente no crescimento em altura das plantas, visto que os tratamentos com ausência de nutrientes (areia, fibra de coco e controle) obteve valores menores em relação aos tratamentos MS líquido e K líquido.



**Figura 7** - Medidas do crescimento inicial em altura (cm) de plântulas de *Vriesea sucrei* germinadas *in vitro*, 120 dias após a inoculação nos tratamentos de germinação. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. DMS = 0.12237.

Após 120 dias de cultivo, o tratamento controle resultou em plântulas com maior número de folhas, seguido por MS líq., K líq., areia e fibra de coco (Figura 8). Novamente, o substrato fibra de coco se destacou como o tratamento que obteve os menores valores, apresentando em média 0,2 folhas/planta. Este resultado contrasta com aquele obtido por Demattê (2001, 2002), onde se verificou que as plantas de *Tillandsia gardneri* cultivadas em substratos contendo fibra de coco apresentaram maior número de folhas, em relação aquelas cultivadas em xaxim. No entanto, para o cultivo

de *Cryptanthus sinuosus*, Jasmim e outros (2006) testaram a fibra de coco como substrato alternativo ao xaxim e observaram que as plantas cultivadas na fibra de coco apresentavam um número significativamente menor de folhas. Como os resultados aqui citados são relativos a espécies bastante distintas, características intrínsecas podem estar desempenhando um papel importante na tolerância ou adaptabilidade destas espécies as diferentes condições de cultivo.



**Figura 8** - Medidas do crescimento inicial em número de folhas das plântulas de *V. sucrei* germinadas *in vitro*, 120 dias após a inoculação nos tratamentos de germinação. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. DMS = 0.67581.

Com base nos dados de crescimento inicial, seria recomendado que após a germinação em água destilada, as plântulas sejam transferidas para o meio K líq. ou MS líq., visto que ambos promoveram bons resultados tanto para o crescimento em altura quanto para o número de folhas. No entanto, se for prioridade diminuir ao máximo a probabilidade de contaminação, pois se deseja manter a cultura em condições de

assepsia para utilizações futuras, as sementes podem ser inoculadas para germinar direto nos meios K liq. ou MS liq., cujas porcentagens de germinação também foram 100%.

Contudo, o crescimento das plântulas foi considerado muito lento, sendo que a maior média encontrada para altura e número de folhas após 120 dias de cultura foram 1,0cm e 5.8 respectivamente. Estes resultados estão de acordo com trabalhos de germinação *in vitro* para outras bromélias do gênero *Vriesea* (ALVES; DAL VESCO; GUERRA, 2006).



## 5.5 CONCLUSÕES

a- Para a germinação *in vitro* de sementes de *V. sucrei*, os tratamentos MS líquido, K líquido, areia e controle se mostram igualmente efetivos e comprovam a possibilidade de propagação das espécies fora do seu ambiente natural de regeneração. Por motivos de redução de custos, sugere-se a utilização de água destilada para a germinação;

b- Devido a sua alta taxa de mortalidade, os meios de cultura gelificados com agar não são indicados para a germinação e crescimento inicial da espécie *V. sucrei*;

c- Os tratamentos contendo meio nutritivo (MS líquido e K líquido) seriam os mais indicados para a obtenção de plantas com crescimento inicial mais vigoroso, tanto em altura quanto em número de folhas;

d- O crescimento das plântulas de *V. sucrei* germinadas *in vitro* é prejudicado por altas concentrações de sais no substrato, como ocorreu no substrato fibra de coco.

## 5.6 REFERÊNCIAS

- ABAD M; NOGUERA P; PUCHADES R; MAQUIERIRA A; NOGUERA V. Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dusts for use as peat substitute for containerized ornamental plants. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 241-245, 2002.
- ABREU, M.E.P.; GARCIA, Q.S. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae) ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v. 19, n.1, p.149-154, 2005.
- CARRIJO OA; LIZ RS; MAKISHIMA N.. Fibra de coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, n. 20: 533-535, 2002.
- CUZZUOL, G.R.F.; LUCAS, N.M.C. Germinação de sementes de *Matelea maritima* (Jack.) Woods (Asclepiadaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 1-7, 1999.
- D'ANDRÉA JC; DEMATTÊ MESP. Effect of growing media and fertilizers on the early growth of *Aechmea fasciata* Bak. **Acta Horticulturae**, n. 511, p. 271-276, 2000.
- DEMATTÊ M.E.S.P.; OSHIRO L. Substratos e fertilizantes no crescimento e na floração de *Aechmea fasciata* BAK. (Bromeliaceae). In: **Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais**, 13. Resumos... São Paulo: SBFPO. p. 107, 2001.
- DEMATTÊ M.E.S.P. Cultivo de *Tillandsia gardneri* Lindl. (Bromeliaceae) em substratos contendo ou não xaxim. In: **Congresso Brasileiro de Olericultura**, 42. Resumos...Uberlândia: SOB (CD-ROM), 2002.
- DROSTE, A.; SILVA, M.A.; MATOS, V.A.; ALMEIDA, W.J. In vitro Culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two Vulnerable Bromeliads Native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.5, p.717-722, 2005.
- DUARTE, F.E.; CARNEIRO, M.; CARNEIRO, I. **Qualidade físico-fisiológica de sementes de *Aechmea tocartina* Baker obtidas de frutos com diferentes graus de maturação.** Goiás, [2000?].
- EVANS MR; KONDURU S; STAMPS RH. Source variation in physical and chemical properties of coconut coir dust. **HortScience**, n.31, p.965-967, 1996.
- FENNER, M. **Seed Ecology**. Chapman & Hall, London, 1985.
- GARCIA, Q.S.; DINIZ, I.S.S. Comportamento germinativo de três espécies de *Vellozia* da Serra do Cipó, MG. **Acta botânica brasileira**, v. 17, n. 4, p. 487-494, 2003.
- GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, p. 19-28, 1990.
- HANDRECK KA. Properties of coir dust, and its use in the formulation of soilless potting media. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 24, p. 349-363, 1993.
- JASMIM, J.M.; TOLEDO, R.R.V.; CARNEIRO, L.A.; MANSUR, E. **Fibra de coco e adubação foliar no crescimento e na nutrição de *Cryptanthus sinuosus*.** Horticultura Brasileira, v.24, p.309-314, 2006.

- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, 14, p. 214-217, 1946.
- KONDURU S; EVANS MR. Coconut husk and processing effects on chemical and physical properties of coconut coir dust. **HortScience**, v. 34, p. 88-90, 1999.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**. v.2, n.2, p.176-177, 1962.
- MATTHEWS, V. H.; RAO, P. S. In vitro regeneration in lateral bud explant of *Cryptanthus bromelioides* var. *Tricolor* M.B. Foster. **Plant Cell Rep.** v.1, p.108–110, 1982.
- MEEROW AW. Coir dust, a viable alternative to peat moss. **Greenhouse Product News**, v.1, p.17-21, 1997.
- MEKERS, O. Zaai en vermeerdering *in vitro* van Bromeliaceae. Mededelingen Rijksst. **V. Sierplantenteelt**, n.37, p.11-23, 1976.
- MEKERS, O. In vitro propagation of some Tillandisoidea (Bromeliaceae), **Acta Horticultural**, v. 78, p. 311-317, 1977.
- MERCIER, H. and KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell Tis. and Org. Cult.**, v. 30, p. 247-249, 1992.
- MERCIER, H. and KERBAUY, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Bromeliad**, v. 44, p. 120-124, 1994.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. **Selbyana**, v.16, p. 147-149, 1995.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads. In: **Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry - Serie High-Tech and Micropropagation**. Volume 40, Springer-Verlag, New York, p. 43-57, 1997.
- MERCIER, H.; NIEVOLA C.C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidália**, v.1, n.1, p.57-62, 2003.
- MOREL, G.M., WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany** , n.38, p.138–140, 1951.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PIERIK, R. L. M.; SPRENKELS, P. A. Vegetative propagation of *Aechmea fulgens* in vitro. **J. Bromeliad Soc.** v.89, p.210–213, 1989.
- PIERIK, R. L. M.; SPRENKELS, P. A. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. **J. Bromeliad Soc.** v.41, p.9–12, 1991.
- PICKENS, K.A.; WOLF, J.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Adventitious Bud Development and Regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.** v.42, p.348-353, 2006.

ROGERS, S.E. Micropopagation of *Tillandsia dyeriana*. **Journal of Bromeliads Society**. v. 34, p. 111-113, 1984.

ZIMMER, K.; PIEPER, W. Methods and problems of clonal propagation of bromeliads in vitro. **Acta Hort.** v.64, p.25–29, 1976.

## **6. Capítulo 2- Banco de germoplasma *in vitro* de *Vriesea sucrei***

## 6.1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade no mundo está em declínio numa velocidade sem precedentes. Durante o período entre 1996 e 2004, um total de 8.321 espécies de plantas foram adicionadas a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais (IUCN, 2004). Durante este período, houve também um aumento de mais de 60% do número de plantas registradas como criticamente em perigo (SARASAN et al., 2006). Estes fatos são alarmantes e por isso, medidas conservacionistas imediatas são necessárias a fim de proteger muitas destas espécies, dentre elas a espécie *Vriesea sucrei*, objeto de estudo deste trabalho.

A erosão genética causada pela destruição de habitats, pela seleção natural e pelos agentes bióticos e abióticos vêm aumentando o interesse pela conservação de germoplasma vegetal. O aumento da ameaça à diversidade das plantas está associado à perda dos habitats pela expansão das atividades da agricultura e pecuária, à exploração predatória e à exigência de mais terras para a moradia, indústria e estradas (GHAZANFAR, 1998).

Com a intensa atividade extrativista de espécies florestais nativas, tornou-se importante a aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais para a conservação de germoplasma, permitindo com que o material vegetal de uma determinada espécie esteja disponível para sua utilização futura. Com isso, as coleções de germoplasma passaram a ter papel fundamental para conservação de espécies ameaçadas de extinção.

Bancos de germoplasma são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro, onde não ocorre o descarte de acessos. (VEIGA, 1998).

Segundo Veiga (1998), os bancos de germoplasma podem ser classificados em bancos de base ou em bancos ativos. Os bancos de base são aqueles em que se conserva o germoplasma em câmaras frias (conservação de 1°C até -20°C), *in vitro* (conservação de partes vegetais em meio de cultura de crescimento) ou em criopreservação (conservação em nitrogênio líquido a -196°C), por longos prazos. Os bancos ativos são

aqueles que estão próximos ao pesquisador, nos quais ocorre o intercâmbio de germoplasma e plantios freqüentes para caracterização.

Os objetivos de um banco de base são diferentes dos de bancos ativos de germoplasma. Bancos de base objetivam apenas a conservação por meio da manutenção máxima da variabilidade genética, quer seja de populações de uma espécie silvestre quer seja de acessos de uma espécie cultivada ou mesmo de um grupo de espécies de mesmo gênero. Já os bancos ativos têm por objetivos efetuar a caracterização fenotípica-agronômica mínima e a multiplicação com manutenção da identidade genética que permita ao melhorista escolher os caracteres de interesse, para a inclusão nos ensaios de obtenção de novos cultivares (VEIGA, 1998).

Apesar da conservação de espécies ser mais eficiente através da manutenção de populações selvagens em seu ambiente natural (conservação *in situ*), a conservação *ex situ* pode ser usada para complementar a conservação *in situ*, e, em alguns casos, pode representar a única opção para algumas espécies (MAUNDER et al., 1998; RAMSAY et al., 2000). A importância da conservação *ex situ* obteve reconhecimento internacional com a sua inclusão no Artigo 9 da Convenção da Diversidade Biológica (CBD) (GLOWKA et al., 1994).

As técnicas de cultura *in vitro* de plantas, como a manutenção de plântulas provenientes da germinação *in vitro* em bancos de germoplasma, são ferramentas valiosas na conservação *ex situ* de espécies ameaçadas.

Tem sido postulado que a manutenção de culturas *in vitro* é dispendiosa, no entanto, esta técnica possui alto potencial de aplicação (WITHERS; WILLIAMS, 1999). Deve ser levado em consideração que a vulnerabilidade consiste na principal desvantagem de coleções de germoplasma mantidas sob condições de campo. As plantas ficam sujeitas a ataques por patógenos, variações climáticas e podem ser perdidas devido a falhas na identificação (POMPELLI; GUERRA, 2004). Assim, a conservação *in vitro* se torna atrativa por razões tanto práticas como econômicas. Considerando estes aspectos, Withers e Williams (1999) afirmam que a conservação *ex situ* seria a forma mais eficiente para a conservação de germoplasmas vegetais.

## **6.2 OBJETIVO**

Analisar diferentes meios de cultura, e temperaturas na manutenção de plantas de *V. sucrei* num banco de germoplasma *in vitro* e *ex situ*.



### 6.3 MATERIAL E MÉTODOS

Plantas com altura maior ou igual a 0,8 cm, provenientes de germinação *in vitro*, foram inoculadas em frascos de vidro contendo 10 mL de meio de cultura. As plantas foram submetidas a tratamentos de conservação contendo as seguintes variáveis fisiológicas:

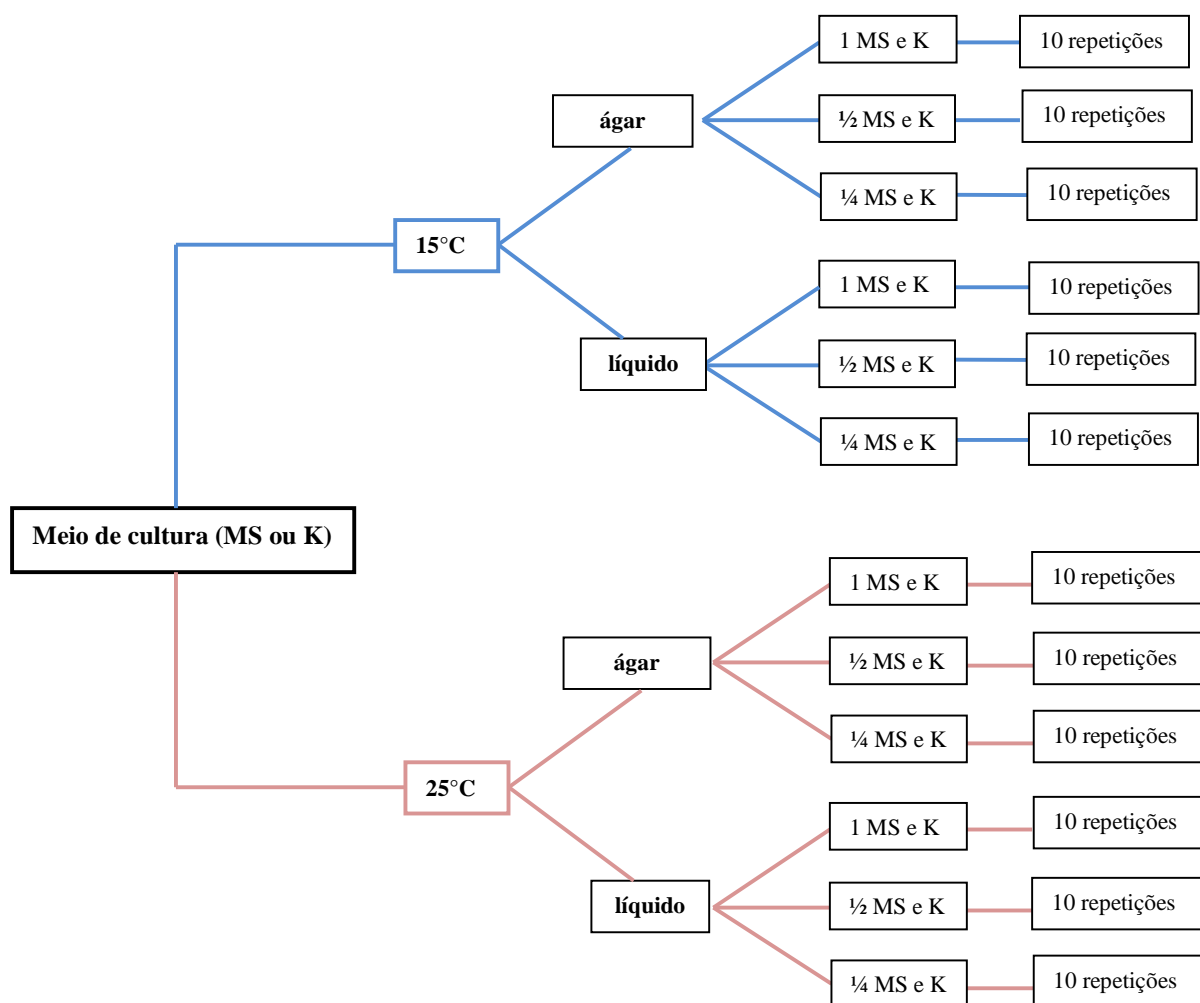
- formulação do meio de cultura : Murashige e Skooge (MS) e Knudson (K);
- concentração de macro e micronutrientes do meio de cultura : 1, ½ e ¼;
- estado físico do meio de cultura : gelificado com ágar e líquido
- temperatura de incubação : 15°C e 25°C.

Dessa forma foram aplicados 24 tratamentos de conservação, com 10 repetições por tratamento e 01 planta por parcela, totalizando 240 plantas, seguindo um fatorial do tipo 2x3x2x2 (Figura 1).

Ao meio de Murashige e Skooge (MS) foi adicionado vitaminas de Gallo (1974), sacarose (30 g/L) e inositol ( 0,1 g/L) (Anexo 1). Ao meio Knudson (K) foi adicionado somente sacarose (20 g/L) (Anexo 2).

O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem, conforme sugestões de Droste e outros (2005). Todo o material de trabalho, incluindo água destilada, bisturis, pinças e outros instrumentos e vidrarias foram esterilizados em autoclave à 120°C, 1atm por 20 minutos. A renovação dos meios de cultura ocorreu em intervalos de três meses.

Plântulas mantidas a 25°C foram acondicionadas em salas de crescimento com radiação de  $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12 horas luz. Plântulas mantidas a 15°C foram acondicionadas em câmara de germinação da marca Fanem® com fotoperíodo ajustado para 12 horas luz.



**Figura 1-** Esquema do delineamento experimental para análise dos fatores físicos e químicos para banco de germoplasma de *Vriesea sucrei*.

Medidas de altura (cm) de todas as plântulas foram realizadas no dia da inoculação e após 120 dias em cultura. Os dados de altura foram utilizados para obter o valor de incremento absoluto em altura ( $\text{altura}_{\text{dia0}} - \text{altura}_{\text{dia120}}$ ), visto que a altura das plântulas no início do experimento não eram iguais. Aos 120 dias, também foram realizadas análises de teor de clorofila “a”, “b”, total e carotenóides; porcentagem de sobrevivência, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz (cm) e anatomia do tecido foliar.

Para a determinação dos teores dos pigmentos fotossintéticos utilizou-se a planta inteira, devido ao seu tamanho diminuto. Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos utilizando-se 6ml de DMSO para cada 0,1g de massa fresca total da planta. As plantas permaneceram no DMSO durante sete dias (168 horas) no escuro. No quinto dia de armazenamento, as plantas, ainda no DMSO, foram colocadas na estufa a 65<sup>o</sup>C durante 50 minutos a fim de acelerar a extração dos pigmentos. Foram determinadas as leituras da densidade ótica a 645 e 663nm, segundo metodologia descrita por Barboza e outros (2008) para plantas de abacaxi (*Ananas comosus*) cultivadas *in vitro*. Os teores de clorofila foram expressos em mg.g<sup>-1</sup>.MF, e calculados de acordo com as equações de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987), conforme segue:

$$\text{Clor a} = (12,7.A663 - 2,69.A645 / 1000MF).V$$

$$\text{Clor b} = (22,9.A645 - 4,68.A663 / 1000MF).V$$

$$\text{Clor. Total} = (20,2.A663 - 2,69.A645 / 1000MF).V$$

Em que: A663 = absorbância a 663 nm; A645 = absorbância a 645 nm; V = volume da amostra (mL); MF = massa fresca da planta (g).

A análise anatômica foi efetuada na maior folha de uma planta, escolhida de forma aleatória, de cada tratamento. Amostras do terço mediano foliar foram fixadas em FAA 50 (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica crescente (50, 60, 70, 80, 90, 100%) e incluídas em resina glicol-metacrilato (Leica Historesin®). Foram realizadas secções transversais em micrótomo rotativo, com 8 µm de espessura, as quais foram coradas com Azul de toluidina 0,05%, pH 4,3 (O'Brien et al., 1964). Depois de coradas, as lâminas histológicas foram montadas em resina sintética Entellan (Merck®). Os aspectos mais relevantes foram fotografados em fotomicroscópio Nikon.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os valores absolutos do incremento em altura (altura inicial – altura final), número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz não seguiam distribuição normal e, portanto, foram analisados pela aplicação do teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os valores de porcentagem de sobrevivência das plântulas foram transformados em arco seno  $\sqrt{p}$  e analisados pela variância dos dados (ANOVA), seguida do teste de Tukey (SNEDECOR

e COCHRAN, 1967) do programa ASSISTAT (versão 7.5 beta, 2008). Diferenças foram consideradas significativas para valores de  $P \leq 0,05$ .

## 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 120 dias em cultura, altas taxas de sobrevivência foram observadas para plantas de *V. sucrei*, em 25°C e 15°C (Tabela 1). A baixa temperatura (15°C) teve influência negativa apenas na porcentagem de sobrevivência dos tratamentos MS Agar (50%) e ½ MS Agar (70%). Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística entre 25°C e 15°C quanto a porcentagem de sobrevivência. Estes resultados sugerem que, com exceção dos tratamentos MS Agar e ½ MS Agar, a manutenção das plantas de *V. sucrei* em 15°C nos demais tratamentos estabilizou o crescimento das plantas sem afetar sua sobrevivência.

A mortalidade que ocorreu em MS liq., ¼ MS liq. e K liq., mantidos a 25°C, foi devido a contaminação do meio de cultura. Os demais tratamentos a 25°C não apresentaram contaminações, proporcionando 100% de sobrevivência.

Lemos e outros (2002) constataram que 15°C proporcionou melhores resultados na implantação de bancos de germoplasma de cana-de-açúcar. Temperaturas mais baixas (12°C) ou mais altas (25°C) promoveram amarelecimento e morte dos explantes. Elevada sobrevivência também relatado na conservação de genótipos de banana a 17°C após 450 dias de cultivo (OLIVEIRA et al., 2000). No entanto, temperaturas muito baixas podem ter efeito drástico. Sandoval e Müller (1989) relataram que 5°C causou morte nos ápices de banana conservados *in vitro*. No entanto, quando a temperatura foi aumentada para 15°C, foi possível conservar os explantes durante 13 a 17 meses. De acordo com Banerjee e De Langhe (1985), danos fisiológicos ocorrem abaixo de 10°C.

Ao comparar os dados de porcentagem de sobrevivência somente entre os tratamentos mantidos a 15°C, observa-se que a baixa temperatura resultou em menor número de sobreviventes nos tratamentos MS Agar e ½ MS Agar (Tabela 1). Não houve diferença estatística entre os demais tratamentos. No entanto, se analisarmos os valores absolutos, percebe-se uma tendência de queda na porcentagem de sobrevivência nos tratamentos contendo ágar (MS Agar, ½ MS Agar, ¼ MS Agar, K Agar, ½ K Agar e ¼ K Agar) quando comparados aos tratamentos contendo o mesmo tipo de meio (K ou MS) e concentração (1, ½ e ¼), porém na forma líquida. A escolha entre ágar (meio

gelificado) ou papel filtro (meio líquido) como suporte para o explante, varia de uma espécie para outra (GEORGE, 2008). Davis et al. (1977) constatou que ápices caulinares cultivados sobre pontes de papel filtro não se desenvolviam tão bem quanto aqueles cultivados em meio gelificado com Agar (0,6%). Já o cultivo de gemas axilares de *Leucospermum* em pontes de papel filtro resultou em sobreviventes e em meio gelificado não (DAVIS et al., 1977). Miller e Murashige (1976) demonstraram que quatro diferentes plantas de folhagem tropical responderam de forma diferente ao cultivo *in vitro* em meio líquido e sólido e que, por isso, a escolha entre um meio de cultura gelificado com agar ou líquido não deve ser feita de forma arbitrária. Pode-se inferir que, no presente trabalho, a presença de agar no meio possa ter restringido a absorção de nutrientes pela planta ou alterado a disponibilidade de água, resultando em quedas na porcentagem de sobrevivência.

A concentração de sais do meio MS também parece ter influência na porcentagem de sobrevivência, pois à medida que se aumenta a diluição da concentração de sais do meio, a porcentagem de sobrevivência aumenta (Tabela 1). Já para os tratamentos contendo o meio K, todos os tratamentos líquidos, independente da diluição, apresentaram 100% de sobrevivência (Tabela 1).

Devido à elevada sobrevivência observada em 21 dos 24 tratamentos testados (Tabela 1), pode-se considerar que o intervalo de 90 dias entre os subcultivos para a renovação do meio de cultura foi satisfatório. Pompelli e Guerra (2004) estabeleceram um banco de germoplasma *in vitro* da bromélia *Dyckia distachya*, no qual a renovação do meio de cultura ocorria a cada 90 dias. No entanto, eles observaram que as culturas podiam ser mantidas por mais de um ano, sem renovar o meio de cultura. Maiores intervalos entre subcultivos são desejáveis na manutenção de bancos de germoplasma, pois diminui os custos do cultivo e o risco de contaminação pela manipulação.

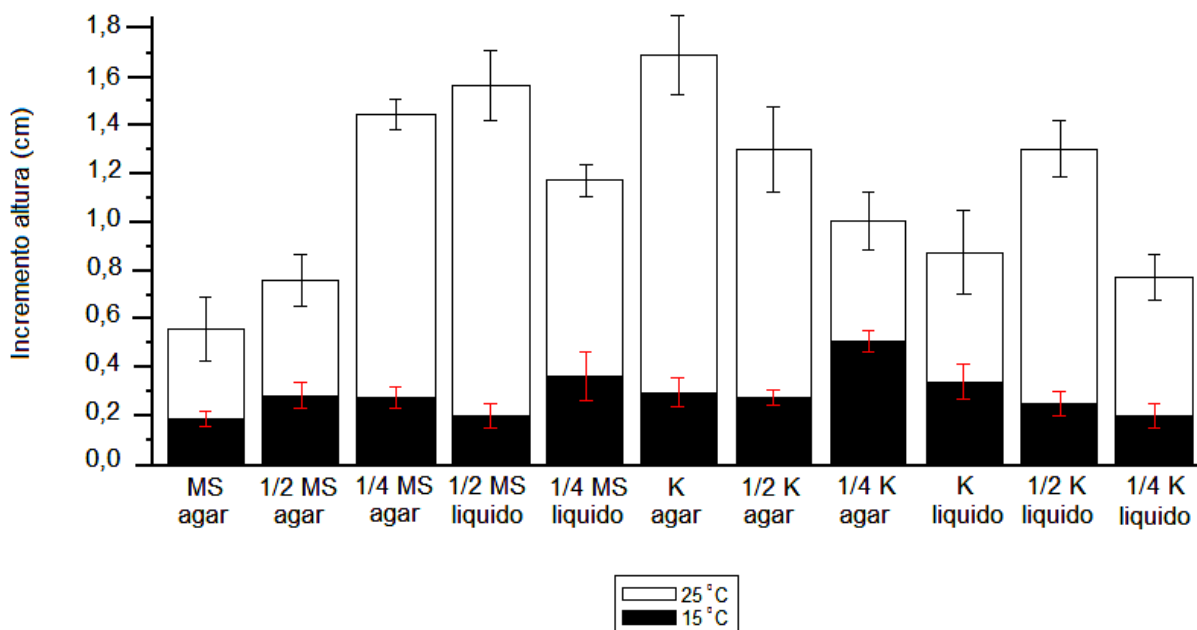
**Tabela 1** – Porcentagem de sobrevivência, número de folhas, número de raízes e comprimento da raiz (cm) das plantas de *V. sucrei* após 120 dias nos tratamentos de germoplasma. Médias seguidas pela mesma letra (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas) não apresentaram diferença significativa. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para o número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz. À porcentagem de sobrevivência foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TRATAMENTOS	SOBREVIVÊNCIA (%)		NÚMERO FOLHAS		NÚMERO RAIZES		COMPRIMENTO RAIZ (cm)	
	25°C	15°C	25°C	15°C	25°C	15°C	25°C	15°C
<b>MS agar</b>	100 aA	50 bB	15,5 aA	5,0 dB	1 dA	0,7 bA	1,33 aA	0,08 aB
<b>1/2 MS agar</b>	100 aA	70 abB	16,0 aA	8,42 bcdB	2 bcdA	0,7 bB	1,46 aA	0,17 aB
<b>1/4 MS agar</b>	100 aA	90 aA	14,1 abA	9,77 abcB	2,8 abcA	1,7 abB	1,4 aA	1,29 aB
<b>MS liq.</b>	20* bB	80 aA	**	**	**	**	**	**
<b>1/2 MS liq.</b>	100 aA	100 aA	11,9 abcA	11,2 abA	3,4 aA	2,2 aB	1,19 aA	0,7 aB
<b>1/4 MS liq.</b>	90* aA	100 aA	12,11 abcA	8,7 bcdB	2,9 abA	1,9abB	1,1 aA	0,71 aB
<b>K agar</b>	100 aA	90 aA	12,6 abcA	7,88 bcdB	3,1 abA	1,4 abB	1,22 aA	0,38 aB
<b>1/2 K agar</b>	100 aA	80 aA	12,1 abcA	7,5 bcdB	2,3 abcdA	1,4 abB	1,0 aA	0,52 aB
<b>1/4 K agar</b>	100 aA	80 aA	13,9 abA	13,0 aA	1,5 cdA	1,2 abA	0,9 aA	0,71 aB
<b>K liq.</b>	80* aA	100 aA	9,62 cA	6,8 cdB	2,2 abcdA	2,2 aA	0,79 aA	0,53 aB
<b>1/2 K liq.</b>	100 aA	100 aA	9,4 cA	8,0 bcdA	3,2 abA	1,4 abB	1,51 aA	0,32 aB
<b>1/4 K liq.</b>	100 aA	100 aA	10,4 bcA	8,8 abcdA	2,2 abcdA	1,8 abA	1,09 aA	0,81 aB

\* A queda do percentual de sobrevivência foi devido exclusivamente à contaminação do meio de cultura.

\*\* Dados não computados devido ao número reduzido de plantas, consequência dos altos índices de contaminação do meio de cultura.

Após quatro meses em cultura, foram sensíveis as diferenças de incremento em altura entre as plantas submetidas aos diferentes regimes de temperatura. A temperatura de 15°C reduziu de forma acentuada o crescimento das plantas (Figura 2). Este resultado era esperado, pois o uso de temperaturas mais baixas no cultivo *in vitro* reduz a ação de enzimas e do metabolismo geral das plantas (LEMOS et al., 2002) promovendo assim um crescimento lento. Não houve diferenças significativas de incremento em altura entre os tratamentos a 15°C (Figura 2). Portanto, a temperatura parece ser o principal fator responsável pelo reduzido crescimento em altura apresentado pelas plantas em 15°C.



**Figura 2** – Valores médios do incremento absoluto em altura (cm) das plântulas de *V. sucrei* mantidas a 25° e 15° C durante 120 dias nos diferentes tratamentos. As barras em cada coluna representam o erro padrão entre as medias de cada tratamento.



As plantas a 25°C apresentaram diferenças estatísticas quanto ao incremento em altura entre os tratamentos aplicados (Figura 2). À medida que diminui a concentração de sais do meio MS gelificado, o incremento em altura aumenta. O inverso é verdadeiro para as plantas cultivadas em meio K, independente do estado físico do meio (gelificado ou líquido), ou seja, maiores concentrações de sais no meio K promovem maior incremento em altura. Deste modo, utilização do meio MS menos concentrado e do meio K sem diluições promoveram um maior crescimento em altura das plantas. Estes resultados demonstram a preferência da espécie por meios de cultura com formulações menos concentradas de macro e micronutrientes, visto que a formulação do meio MS possui maior concentração de micro e macronutrientes em relação ao meio K.

Alguns estudos mostram que para algumas espécies do gênero *Vriesea* as taxas de sobrevivência, multiplicação e conservação foram maiores em meios de cultura contendo baixas concentrações salinas. Merkers (1977) investigou o cultivo *in vitro* de algumas bromélias, incluindo três espécies de *Vriesea*. Ele concluiu que baixas concentrações de sais (1/3 a 1/2) do meio MS ou concentrações normais ou com metade da força iônica do meio K, eram necessários para a multiplicação ou manutenção das plantas *in vitro*. Na maioria dos trabalhos *in vitro* com bromeliáceas foi utilizada a formulação desenvolvida por Murashige e Skoog (1962) (COTE et al., 1991; TOMBOLATO et al., 1998; CARNEIRO et al., 1999; GUERRA et al., 1999). Para a conservação de *Vriesea reitzii*, Rech Filho e outros (2005) sugerem a utilização de meio MS líquido na sua concentração total ou com metade da força iônica. Arrabal e outros (2002) estabeleceram um eficiente sistema de cultivo para a regeneração de segmentos caulinares desfolhados de *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith), no meio MS líquido. Estudos recentes com enfoque nos aspectos fisiológicos de *V. philippocoburgii* e *V. gigantea*, utilizaram o meio K tanto na sua concentração normal quanto na forma diluída (MERCIER, et al., 1997; ENDRES e MERCIER, 2001; ENDRES et al., 2002; ENDRES; MERCIER, 2003).

Não houve diferença para o número de folhas entre as plantas cultivadas a 15°C e 25°C, nos meios 1/2 MS liq, 1/4 K agar, 1/2 K liq e 1/4 K liq. (Tabela 1). Para os demais tratamentos, o cultivo a 15°C resultou em plantas com menor número de folhas. Analisando somente os tratamentos a 15°C com alta porcentagem de sobrevivência, K

liq. e  $\frac{1}{4}$  K Agar resultaram em plantas com menor e maior número de folhas respectivamente. Os demais tratamentos apresentaram valores intermediários e não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1).

Quanto ao número de raízes, não houve diferença entre as plantas cultivadas a 15°C e 25°C, nos tratamentos MS Agar,  $\frac{1}{4}$  K Agar, K liq. e  $\frac{1}{4}$  K liq. (Tabela 1). Os demais tratamentos resultaram em menor número de raízes em 15°C. Entre os tratamentos a 15°C, menores valores foram encontrados nos tratamentos MS Agar e  $\frac{1}{2}$  MS Agar, enquanto os maiores valores nos tratamentos  $\frac{1}{2}$  MS liq. e K liq. Os demais tratamentos possuíam valores intermediários, não havendo diferenças estatísticas entre eles.

O cultivo das plantas de *V. sucrei* a 15°C resultou em plantas com menor comprimento de raiz, não ocorrendo diferença estatística entre eles (Tabela 1).

Neste experimento, todos os resultados de crescimento (incremento em altura, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz) e de sobrevivência sugerem que a manutenção da cultura a 15°C e em meio líquido é mais eficiente para o armazenamento de plantas de *V. sucrei* em bancos de germoplasma *in vitro*, independente do tipo, ou concentração do meio de cultura.

Segundo Guerra e Pompelli (2001), bancos de germoplasma *in vitro* têm como objetivo desacelerar o crescimento de células, tecidos e órgãos para que se possa aumentar ao máximo o intervalo entre os sub-cultivos, ou estendê-los indefinidamente. Com isso, reduz-se a mão-de-obra e o espaço necessário para a sua conservação, além de proporcionar acesso imediato a todo o germoplasma da coleção. Contudo, o crescimento reduzido não pode provocar danos morfofisiológicos que impeça as plantas de retomar seu crescimento no futuro.

O teor de clorofila nas folhas é considerado um dos indicadores do nível de dano que determinado estresse pode estar causando à planta, já que a clorose é, normalmente, um dos primeiros sintomas expressos (CATUNDA et al., 2005).

O teor de clorofila 'a' variou de 0,1 a 0,7mg/g entre os tratamentos (Tabela 2). Os menores teores de clorofila 'a' foram encontrados nos tratamentos ¼ MS agar - 15°C (0,13 mg/g) e ½ K agar - 15°C (0,16 mg/g).; e o maior teor no tratamento ½ MS liq. - 15°C (0,6mg/g).

**Tabela 2** – Tabela de freqüência contendo os teores de clorofila 'a' para os tratamentos de conservação *in vitro* de plantas de *V. sucraei*, após 120 dias de cultivo.

Clorofila 'a' (mg/gMF)	Frequência	Tratamentos
0,1307  ----- 0,2348	2	1/2 K agar - 15 <sup>0</sup> 1/4 MS agar - 15 <sup>0</sup>
0,2348  ----- 0,3389	3	K liq. - 25 <sup>0</sup> K agar - 25 <sup>0</sup> 1/4 K agar - 25 <sup>0</sup>
0,3389  ----- 0,4430	6	1/4 MS liq. - 15 <sup>0</sup> MS agar - 25 <sup>0</sup> 1/2 MS agar - 25 <sup>0</sup> 1/4 K agar - 15 <sup>0</sup> 1/4 K liq. - 25 <sup>0</sup> 1/4 K liq. - 15 <sup>0</sup>
0,4430  ----- 0,5471	7	1/4 MS agar - 25 <sup>0</sup> 1/4 MS liq. - 25 <sup>0</sup> K agar - 15 <sup>0</sup> 1/2 K agar - 25 <sup>0</sup> K liq. - 15 <sup>0</sup> 1/2 K liq. - 15 <sup>0</sup> 1/2 K liq. - 25 <sup>0</sup>
0,5471  ----- 0,6512	3	MS liq. - 15 <sup>0</sup> MS liq. - 25 <sup>0</sup> 1/2 MS liq. - 25 <sup>0</sup>
0,6512  ----- 0,7554	1	1/2 MS liq. - 15 <sup>0</sup>
<b>Total</b>	22 tratamentos	

O teor de clorofila 'b' variou de 0,1 a 0,5mg/g de massa fresca (Tabela 3). Novamente, os tratamentos ½ K agar - 15°C e ¼ MS agar - 15°C resultaram em plantas com menor teor de clorofila 'b', apresentando 0,15 e 0,12 mg/g de massa fresca respectivamente. Os tratamentos ½ MS liq. - 15°, MS liq. - 15°, MS liq. - 25° e K agar - 15° resultaram em plantas com maior teor de clorofila 'b', contendo 0,57; 0,56; 0,54 e 0,52 mg/g de massa fresca, respectivamente.

**Tabela 3** – Tabela de frequência contendo os teores de clorofila 'b' para os tratamentos de conservação *in vitro* de plantas de *V. sucrei*, após 120 dias de cultivo.

Clorofila 'b' (mg/gMF)	Frequência	Tratamentos		
0,1270 I----- 0,2173	2	1/2 K agar - 15 <sup>0</sup>	1/4 MS agar - 15 <sup>0</sup>	
0,2173 I----- 0,3076	3	1/4 K agar - 25 <sup>0</sup>	K agar - 25 <sup>0</sup>	K liq. - 25 <sup>0</sup>
0,3076 I----- 0,3979	7	1/4 MS liq. - 25 <sup>0</sup> 1/4 K liq. - 15 <sup>0</sup> 1/4 K agar - 15 <sup>0</sup>	1/4 K liq. - 25 <sup>0</sup> 1/2 MS agar - 25 <sup>0</sup>	1/4 MS liq. - 15 <sup>0</sup> MS agar - 25 <sup>0</sup>
0,3979 I----- 0,4882	6	1/2 K agar - 25 <sup>0</sup> K liq. - 15 <sup>0</sup>	1/4 MS agar - 25 <sup>0</sup> 1/2 MS liq. - 25 <sup>0</sup>	1/2 K liq. - 15 <sup>0</sup> 1/2 K liq. - 25 <sup>0</sup>
0,4882 I----- 0,5786	4	MS liq. - 25 <sup>0</sup> K agar - 15 <sup>0</sup>	MS liq. - 15 <sup>0</sup>	1/2 MS liq. - 15 <sup>0</sup>
<b>Total</b>	22 tratamentos			

Os teores de clorofila total foram maiores nos tratamentos MS liq. – 15°C, ½ MS liq. – 15°C, MS liq. – 25°C e ½ MS liq. – 25°C (Tabela 4). Valores mais baixos foram encontrados para os tratamentos ½ K agar – 15° e ¼ MS Agar – 15°, reflexo dos seus menores teores de clorofila 'a' e 'b' (Tabela 4). Os teores de clorofila total dos tratamentos inseridos na faixa de 0,54 a 0,75 mg/g de massa fresca (Tabela 4) são similares aos relatados por Tamaki, Mercier e Nievola (2007) para o cultivo *in vitro* de *Ananás comossus* (cv. Smooth Cayenne). Segundo estes autores, estes valores são considerados altos. Isto demonstra que, possivelmente, os teores de clorofila não estariam atuando como um fator limitante ao funcionamento do aparato fotossintético das plantas de *V. sucrei* cultivadas *in vitro*. No entanto, as plantas *in vitro* normalmente apresentam redução nos teores de clorofila, quando comparadas às plantas aclimatizadas (DEJARDINS, 1995; AMÂNCIO et al., 1999; POSPÍSILOVÁ et al., 1999). Por isso, seriam necessários estudos futuros com relação à quantidade de pigmentos fotossintéticos presentes em plantas de *V. sucrei* aclimatizadas, as quais serviriam de comparação entre o ambiente *in vitro* e *ex vitro*.

**Tabela 4** – Tabela de frequência contendo os teores de clorofila total para os tratamentos de conservação *in vitro* de plantas de *V. sucrei*, após 120 dias de cultivo.

<b>Clorofila total</b> (mg/gMF)	<b>Frequência</b>	<b>Tratamentos</b>		
<b>0,2207</b> I----- <b>0,3957</b>	2	1/2 K agar - 15 <sup>0</sup>	1/4 MS agar - 15 <sup>0</sup>	
<b>0,3957</b> I----- <b>0,5707</b>	3	1/4 K agar - 25 <sup>0</sup>	K agar - 25 <sup>0</sup>	K liq. - 25 <sup>0</sup>
<b>0,5707</b> I----- <b>0,7457</b>	6	1/4 K agar - 15 <sup>0</sup>	MS agar - 25 <sup>0</sup>	1/2 MS agar - 25 <sup>0</sup>
		1/4 K liq. - 15 <sup>0</sup>	1/4 MS liq. - 15 <sup>0</sup>	1/4 K liq. - 25 <sup>0</sup>
<b>0,7457</b> I----- <b>0,9207</b>	7	K agar - 15 <sup>0</sup>	1/2 K agar - 25 <sup>0</sup>	1/4 MS agar - 25 <sup>0</sup>
		1/2 K liq. - 15 <sup>0</sup>	K liq. - 15 <sup>0</sup>	1/2 K liq. - 25 <sup>0</sup>
		1/4 MS liq. - 25 <sup>0</sup>		
<b>0,9207</b> I----- <b>1,0987</b>	4	1/2 MS liq. - 15 <sup>0</sup>	MS liq. - 15 <sup>0</sup>	1/2 MS liq. - 25 <sup>0</sup>
		MS liq. - 25 <sup>0</sup>		
<b>Total</b>	22 tratamentos			

Nas tabelas de clorofila 'a' (Tabela 2), 'b' (Tabela 3) e total (Tabela 4), podemos observar que há uma tendência dos tratamentos contendo meio de cultura MS na forma líquida de apresentarem os maiores teores de pigmentos. Observações visuais corroboram com estes resultados, pois demonstraram que, em geral, as plantas dos tratamentos contendo MS eram aparentemente mais verdes em relação às plantas dos tratamentos contendo meio K (dados não mostrados). Além disso, todos os tratamentos contendo meio K (independente da temperatura, diluição ou estado físico do meio) apresentaram folhas com clorose terminal e necrose em alguns casos (dados não mostrados). A análise visual também mostrou que as plantas nos tratamentos contendo meio gelificado a 15° apresentavam desprendimento de folhas verdes, aparentemente saudáveis, sem sinais visuais de clorose ou necrose. Já nos tratamentos constituídos de meio líquido a 15° isto não ocorria (dados não mostrados).

O nitrogênio, ferro, manganês e magnésio são elementos minerais essenciais à maquinaria fotossintética (BRITO, 2006). O fato do meio MS possuir maior concentração desses nutrientes em sua formulação pode ter levado a um aumento da

síntese clorofila neste meio, face ao meio K. Portanto, tratamentos contendo meio MS na forma líquida e a 15° seriam os indicados para a manutenção de plantas de *V. sucrei* *in vitro*, pois além de desacelerar o crescimento, resultam em altas porcentagens de sobrevivência e promovem alto teor de clorofila 'a', 'b' e total.

Secções transversais do limbo de *Vriesea sucrei* cultivada *in vitro*, a 15<sup>o</sup>C e 25<sup>o</sup>C, caracterizam-se, de modo geral, pela presença de: epiderme unisseriada, revestida por cutícula delgada; escamas em ambas as faces da epiderme; estômatos restritos à face abaxial; hipoderme aquífera voltada para as faces abaxial e adaxial da epiderme; parênquima clorofiliano homogêneo e feixes vasculares colaterais (Fig. 1A-E). Tais características são comuns em Bromeliaceae e parecem ser típicas ao gênero *Vriesea* (PROENÇA; SAJO, 2007). Segundo Schimper (1884 apud Benzing 1976), a presença de mesofilo suculento e escamas epidérmicas são características de espécies epífitas atmosféricas extremas.

Na epiderme, as células da face adaxial apresentam formato retangular, enquanto as células da face abaxial possuem formato predominantemente arredondado e são menores, todas recobertas por cutícula delgada (Fig. 1B). Os estômatos situam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas ou encontram-se levemente proeminentes em relação às mesmas (Fig. 1E). A presença de cutícula pouco espessada e estômatos projetados é uma condição comum em espécies cultivadas *in vitro* onde as plantas crescem sob alta umidade relativa do ar (UR%) e baixa luminosidade (DONNELLY; VIDAVER 1984; WETZSTEIN; SOMMER, 1983; LEE *et al.* 1988; BLANKE; BELECHER, 1989). Mayer e outros (2008) constataram a presença de estômatos projetados em plantas de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *in vitro*. No entanto, quando aclimatizadas, os estômatos retornam para a posição abaixo das células epidérmicas, como ocorre nas plantas encontradas *in vivo*. As escamas encontram-se inseridas em ambas as faces da epiderme pelas células do pedículo, as quais possuem formato retangular (Fig. 1C-D). Em Bromeliaceae, as escamas estão relacionadas com a absorção de água e nutrientes (SCATENA; SEGECIN, 2005). Além disso, forma uma cobertura densa protegendo a epiderme contra a radiação intensa, desempenhando importante papel no processo de aclimatização cujo principal fator limitante é a redução da umidade relativa do ar (SUTTER, *et al.* 1992).

No mesofilo, em ambas as faces da epiderme, observa-se uma hipoderme aquífera constituída por células aclorofiladas, volumosas e de paredes delgadas. O número de camadas celulares da hipoderme aquífera é sempre maior na região voltada para a face adaxial da epiderme (Fig. 1A-C; 2A-C). A hipoderme é considerada a estrutura mais comum para o armazenamento de água, estando presente em espécies epífitas de Gesneriaceae, Eriaceae, Clusiaceae, Arabiaceae e Bromeliaceae (MADISON, 1977). Além de armazenar água absorvida pelas escamas, a hipoderme protege a região clorofiliana da intensa luminosidade, favorecendo o processo fotossintético (BRIGHGNA, FIORDI, PALANDRI, 1984) e conferindo vantagens adaptativas durante o processo de aclimatização. Segundo Py (1969), quando em condições de deficiência hídrica, as células suprem as necessidades de água da planta, contraindo-se e recuperando-se posteriormente, quando em condições adequadas de suprimento de água. A presença da hipoderme aquífera nas folhas foi correlacionada com o alto índice de sobrevivência de plântulas de abacaxi cultivadas *in vitro*, quando transferidas para casa de vegetação (BARBOZA et al., 2006). Espírito Santo e Pugialli (1998) atribuem a presença da hipoderme nas faces adaxial e abaxial da epiderme à maior exposição à luz. Embora esta característica também tenha sido observada nas folhas de *Vriesea sucrei* cultivadas *in vitro*, parece pouco provável que a presença da hipoderme em ambas as faces esteja relacionada à maior exposição à luz, já que a planta foi cultivada sob condições de baixa luminosidade. Portanto, possivelmente, trata-se de uma característica geneticamente determinada. O parênquima clorofiliano ocupa a região central do limbo e constitui-se por células arredondadas, deixando poucos espaços entre si (Fig. 1B; 2A-C).

Os feixes vasculares do tipo colateral (Fig. 1E) estão dispostos em uma única série ao longo do limbo, sendo o feixe central mais desenvolvido que os demais (Fig. 1A; 2A-C).

De modo geral, as plantas cultivadas a 25<sup>0</sup>C, independente do tipo (MS; K), concentração (1; ½; ¼) e estado físico (líquido; gelificado) do meio de cultura, apresentaram folhas com sistema vascular mais desenvolvido (Fig. 1A), em relação àquelas cultivadas a 15<sup>0</sup>C (Fig. 2C). Este resultado era esperado, visto que, as plantas cultivadas a 25<sup>0</sup>C apresentaram maiores taxas de crescimento.

Não foram observadas alterações na estrutura anatômica do limbo nas plantas cultivadas nos tratamentos mantidos a 25<sup>0</sup>C. Contudo, verificaram-se diferenças estruturais entre os tratamentos mantidos a 15<sup>0</sup>C, quanto a(o): desenvolvimento do sistema vascular; colapso de células da hipoderme e ocorrência de depressões no limbo.

Nos tratamentos contendo meio K, independente da concentração e estado físico do meio, observaram-se depressões no limbo causadas pelo colapso de células da hipoderme (Fig. 2A). Chamou a atenção o desenvolvimento reduzido do feixe vascular central em relação aos tratamentos MS 15<sup>0</sup>C (Fig. 2A). Vale ressaltar que na concentração mais elevada deste meio (K/A e K/L) estas alterações foram menos pronunciadas. Segundo Albarello *et al.* (2001), a redução no número de elementos condutores nas plantas cultivadas *in vitro* podem inviabilizar a aclimatização das mesmas.

Nos tratamentos contendo meio MS, verificou-se que a concentração total do meio (MS) foi o fator responsável pelo aparecimento de alterações estruturais no limbo (Fig. 2B), como as observadas nos tratamento contendo meio K. Nas concentrações ½ e ¼ MS, o limbo mostrou características anatômicas semelhantes àquelas presentes nas plantas cultivadas a 25<sup>0</sup>C, independente do estado físico do meio (Fig. 2C).



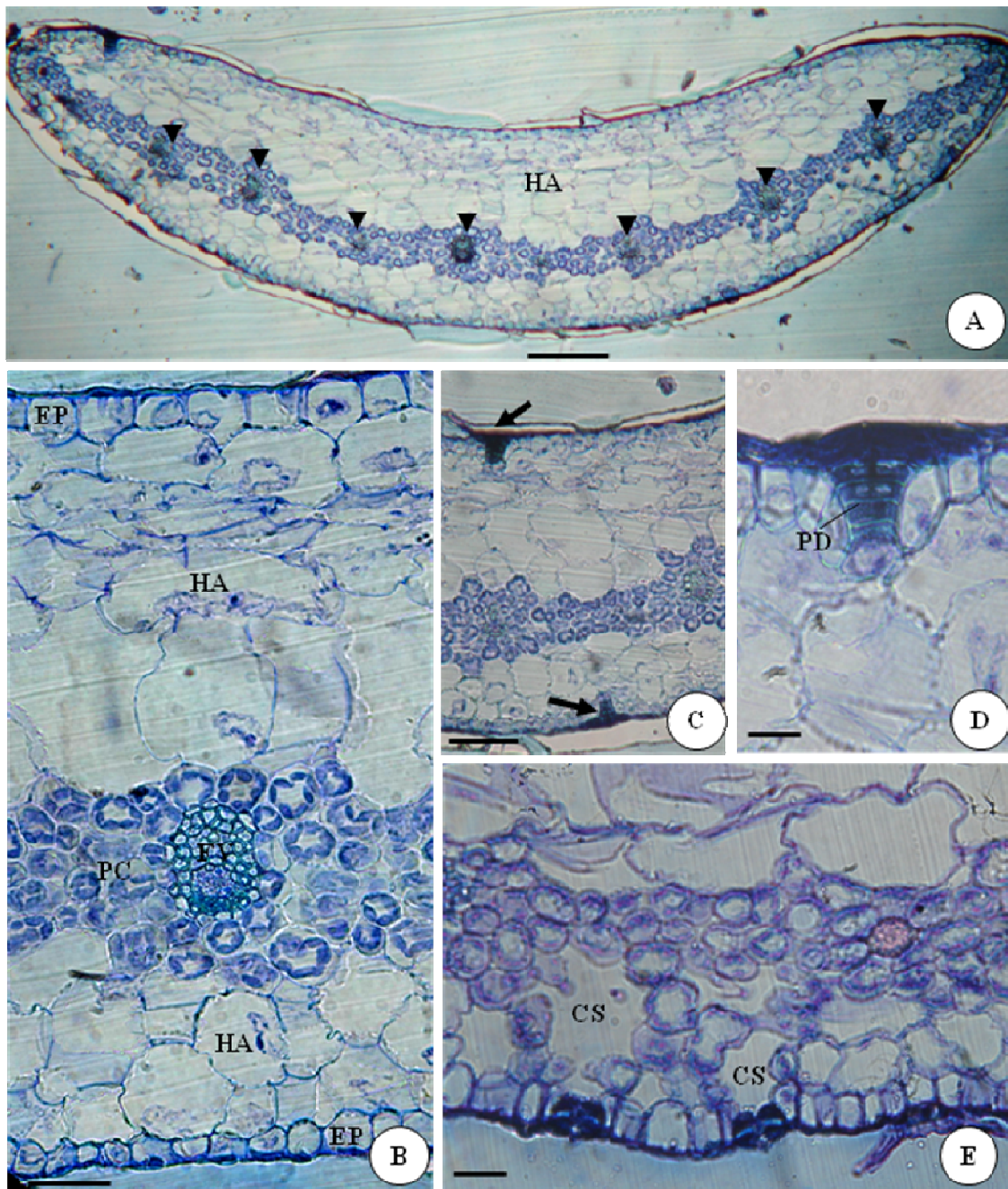


Figura 1. A-E. Aspectos anatômicos do limbo de *Vriesea sucrei*, cultivada *in vitro* a 25°C. A. Aspecto geral. B. Detalhe da figura anterior. C. Escamas em ambas as faces da epiderme. D. Detalhe de uma escama, evidenciando células do pedículo. E. Estômatos, na face abaxial da epiderme. (CS= câmara subestomática; EP = epiderme; FV = feixe vascular colateral; HA = hipoderme aquifera; PC = parênquima clorofiliano; PD = pedículo; pontas de seta = feixes vasculares (A); setas = escamas). Barras = 200µm (A,C); 50µm (B); 25 µm (D-E).

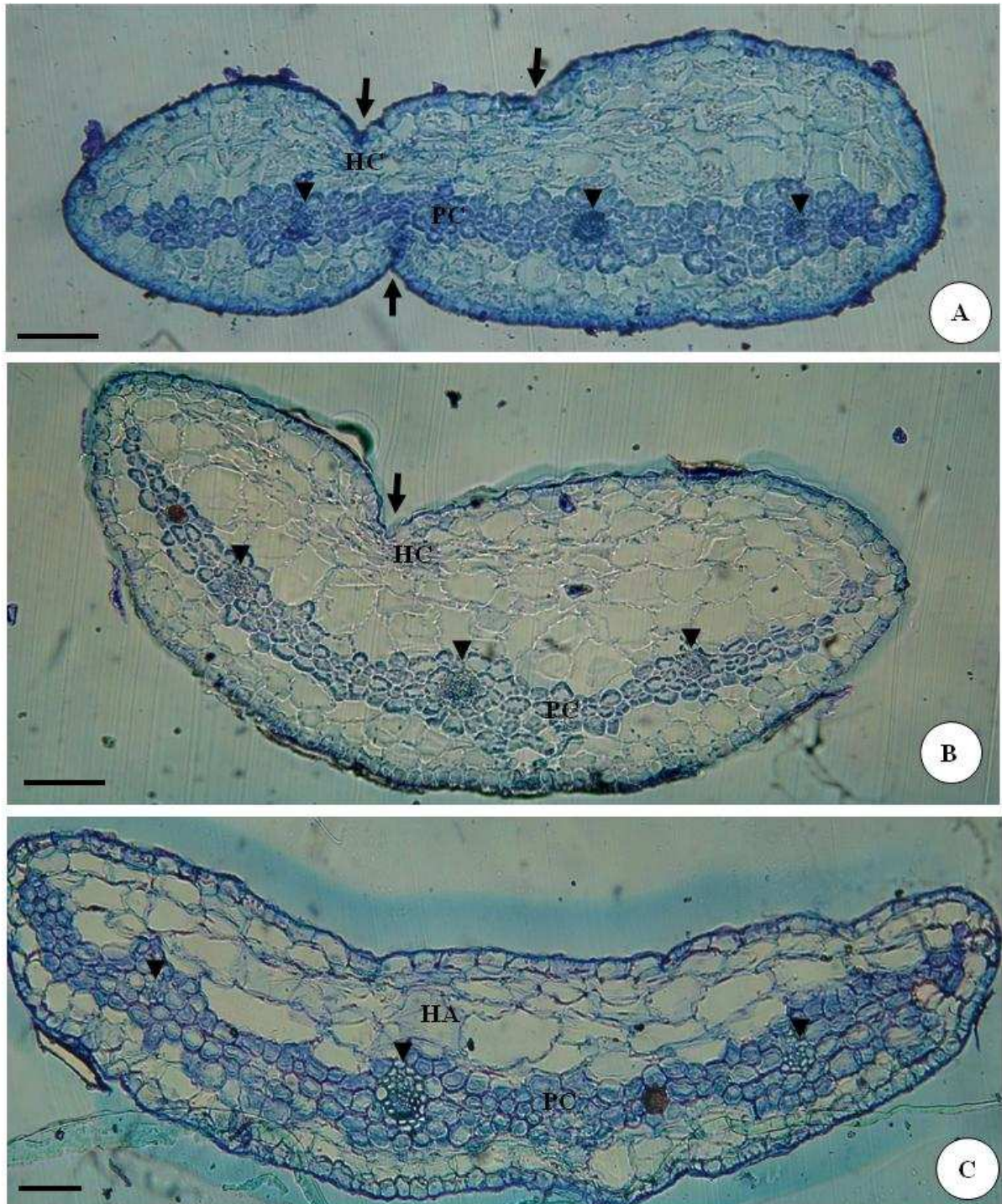


Figura 2. A-C. Aspectos anatômicos do limbo de *Vriesea sucreei*, cultivada in vitro a 150C. A. Aspecto geral dos tratamentos contendo meio de cultura K, evidenciando depressões na epiderme e colapso das células da hipoderme aquífera. B. Aspecto geral dos tratamentos contendo meio de cultura MS na concentração total, evidenciando depressões na epiderme e colapso das células da hipoderme aquífera. C. Aspecto geral dos tratamentos contendo meio de cultura MS nas concentrações diluídas ( $\frac{1}{2}$  MS e  $\frac{1}{4}$  MS). (HC = colapso da hipoderme; HA = hipoderme aquífera; PC = parênquima clorofiliano; pontas de seta = feixes vasculares; setas = depressões na epiderme. Barras = 200 $\mu$ m (A-C).

## 6.5 Conclusões

- a) O crescimento naturalmente lento da espécie *V. sucrei* favoreceu sua conservação em bancos de germoplasma *in vitro*;
  
- b) A baixa temperatura de 15°C foi o fator determinante para a redução do crescimento de *V. sucrei in vitro*, sem, contudo, comprometer a sobrevivência das plantas;
  
- c) O tratamento ½ MS líquido em 15°C apresentou alta porcentagem de sobrevivência, plantas com crescimento reduzido, alto teor de clorofila e estrutura anatômica sem anormalidades. Com base nestes resultados, podemos sugerir que esse tratamento seja o mais indicado para a implantação de bancos de germoplasma *in vitro* de *V. sucrei*.

## 6.6 REFERÊNCIAS

ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, p.35-46, 2001.

AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J. P.; CHAVES, M. M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, p. 31-37, 1999.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.

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

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

BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, v.4, p.351-354, 1985.

BARBOZA, S.B.S.C.; PORTES, T.A.; TEIXEIRA, J.B.; COPATI, L.A.; LEDO, A.S. Diferentes Metodos para Extração de Clorofilas em Folhas de Abacaxi Cultivadas *in vitro*. Departamento de Desenvolvimento Agropecuario de Sergipe, **EMBRAPA Tabuleiros Costeiros**, 2008.

BARBOZA, S.B.S.C.; RIBEIRO, D.G.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.185-194, 2006.

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

BLANKE, M.B.; BELECHER, A.B. Stomata of apple leaves cultured in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.19, p.85-89, 1989.

BRIGHIGNA, L.; FIORDI, A.C.; PALANDRI, M.R. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. **Phytomorphology**, v.34, p.191-200, 1984.

BRITO, G., 2006. Micropropagação de duas espécies autóctones da Ilha de Porto Santo (*Olea europaea* L. ssp. *maderensis* Lowe e *Juniperus phoenicea* L.) e estudo da resposta de rebentos in vitro a stress osmótico. **Tese de Mestrado** em Ciências das Zonas Costeiras, Universidade de Aveiro.

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

CATUNDA, M.G.; FREITAS, S.P.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, C.M.M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta Daninha**, Vicosa-MG, v.41, p.481-486, 2002.

CATUNDA, M.G.; FREITAS, S.P.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, C.M.M. Efeitos de Herbicidas na Atividade Fotossintética e no Crescimento de Abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta Daninha**, Vicosa-MG, v.23, n.1, p.115-121, 2005.

COTE, F.; DOMERGUE, R.; FOLLIOU, M.; BOUFFIN, J.; MARIE, F. Micropropagação *in vitro* de l'ananas. **Fruits** numero especial Ananas, p.359-366, 1991.

DAVIS, M.J.; BAKER, R.; HANAN, J.J. Clonal multiplication of carnation by micropropagation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.102, p.48-53, 1977.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Ed.). Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures. **Saint-Paul-lez-Durance**: Centre d'études de Cadarache, p.145-160, 1995.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.109, p.172-176, 1984.

ENDRES, L. eMERCIER, H. (2001), Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **Journal of Plant Physiol.** n.158, p.205-212, 2001.

ENDRES, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER, H. *In vitro* nitrogen nutrition and hormonal pattern in bromeliads. **In vitro Cel. And Dev. Biol. – Plant.** V.38, p.481-486, 2002.

ENDRES, L.; MERCIER, H. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated *in vitro*. **Plant Physiol. and Biochem.**, v.41, p.181-187, 2003.

ESPÍRITO SANTO, A.; PUGIALLI, H.R.L. Estudo da plasticidade anatômica foliar de *Stromanthe thalia* (Vell.) J.M.A. Braga (Marantaceae) em dois ambientes de Mata Atlântica. **Rodriguésia**, v.50, p.107-122, 1998.

GEORGE, F. E.; HALL, A. M.; JAN DE KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3 ed. V. 1, Springer, p.360, 2008.

GLOWKA, L.; BURHENNE-GUILMANN, F.; SYNGE, H.; MCNEELY, J. A.; GUNDLING, L. **A guide to the convention on biological diversity** (environmental policy and law paper no. 30). Switzerland: IUCN; 1994.

GUERRA, M.P.; VESCO, L.L. Dal.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesq. Agro. Bras.** v. 34, p.1557-1563, 1999.

GUERRA, M.P.; POMPELLI, M.F. Conservação de germoplasma *in vitro*. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, 2001.

IUCN. 2004 IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) Downloaded 14 Dezembro 2007.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw- Hill Book, p.528, 1940.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (BAKER) L.B. SMITH *in vitro***. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2005.

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

LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.167-171, 1988.

LEMOES, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; RAMALHO NETO, C.E.; ALBUQUERQUE, M.M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**. New York: Academic, p.350-382, 1987.

IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species**, 2004. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) Downloaded 14. Acesso em: dezembro de 2007.

JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Co., New York.

MADISON, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbyana**, v.2, p.1-13, 1977.

MAUNDER, M.; HIGGINS, S.; CULHAM, A. Neither common nor garden: the garden as a refuge for threatened plant species. **Curtis's Bot. Mag.** v.15, p.124-132, 1998.

MEKERS, O. *In vitro* propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Acta Hort.**, v.78, p.311-320, 1977.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 4th ed. Bern: International Potash Institute, p.687, 1987.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; SOTTA, B. AND MIGINIAC, E. Effects of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. **Plant Cell and Environm.**, v.20, p.387-392, 1997.

MILLER, L.R.; MURASHIGE, T. Tissue culture propagation of tropical foliage plants. **In Vitro**, v.12, p.797-813, 1976.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N. & McCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373.

OLIVEIRA, R.P.; SILVA, S.O.; SILVA, K.M.; SILVEIRA, D.G. *In vitro* conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agrícola**, v.57, n.2, p.245-249, 2000.

POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, nº4, p.273-279, 2004.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 42, n. 4, p. 481-497, 1999.

PROENÇA, S.L.; SAJO, M.G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.319-331, 2004.

PY, C. **La piña tropical**. Barcelona: Blume, 278p., 1969.

RAMSAY, M. M.; JACKSON, A. D.; PORLEY, R. D. A pilot study for the ex situ conservation of UK bryophytes. In: BGCI, ed. EuroGard 2000 – **II European Botanic Gardens Congress**. Canary Islands, Spain: Las Palmas de Gran Canaria;52–57, 2000.

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**, v. 14, p. 1799-1808, 2005.

SANDOVAL, J.; MÜLLER, L. Consideraciones sobre la conservación in vitro de musáceas: posibilidades y limitaciones. **Asbana**, Turrialba, v. 13, n. 31, p. 21-24, 1989.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M.M.; ATHERTON, C.; McMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. Conservation *in vitro* of Threatened plants: progress in the past decade. **In Vitro Cell. Div. Biol. Plant**, v.42, p.206-214, 2006.

SCATENA, V.L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Parana, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.3, p.635-649, 2005.

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

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananás comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea**, 34(1): 69-73, 5 fig., 2007.

TOMBOLATO, A.F.C.; TAKEBAYASHI, S.S.G.; COSTA, A.M.M.; QUIRINO, E.A. Bromelia (*Neoregelia carolinae*). In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. (Eds) **Micropropagacao de plantas ornamentais**. P.22-24. Inst. Agro., Campinas, 1998.

VEIGA, R.F.A. **Acervo dos Bancos de Germoplasma do Estado de São Paulo**. Centro de Recursos Genéticos Vegetais e Jardim Bot. Inst. Agro. Campinas, Campinas, SP, [1998?]. Disponível em: <http://www.iac.br/~crgvjb>. Acesso em: fevereiro de 2008.

WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Scanning electron microscopy of in vitro cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society for Horticultural Science** v.108, p.475-480, 1983.

WITHERS, L. A. In vitro conservation. In: HAWKES, J. G. (Ed.). **Genetic conservation of world crop plants**. San Diego: Academic, p. 31-42, 1991.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas.  
**In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v.1, p.297-330, 1999.



## **7. Capítulo 3- Multiplicação *in vitro* de *Vriesea sucrei***

## 7.1 INTRODUÇÃO

As bromeliáceas conquistaram definitivamente seu lugar no paisagismo e entre colecionadores (MELO, 1996). Melo (1996) considerou ainda que as bromélias tenderiam a se popularizar cada vez mais, e que, de certa forma, poderiam causar uma maior pressão extrativista sobre as populações nativas. Assim, em função da demanda cada vez mais crescente, deve-se considerar que o cultivo de bromélias em grande escala pode trazer vários benefícios, como a redução do custo de produção e principalmente a diminuição do extrativismo predatório de nossas bromélias nativas, permitindo a conservação destas no seu ambiente natural.

As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* permitem a propagação em larga escala, aumentando a produtividade em comparação com os métodos tradicionais de propagação (KANASHIRO, 2005).

Cultura de tecidos vegetais, ou micropropagação, ou ainda, cultura *in vitro* de plantas, é uma metodologia de propagação vegetativa na qual se usa um meio de cultura suplementado com fitorreguladores, ambiente asséptico e condições adequadas de luz e temperatura para promover a multiplicação somática a partir de explantes, obtendo uma planta completa com todos os tecidos e órgãos que lhe são característicos e todas suas funções orgânicas (FEVEREIRO; CAETANO; SANTOS, 2001). O cultivo de explantes somáticos provenientes de uma planta-mãe, gera clones. Os clones são importantes na captura e fixação de ganhos genéticos, como é o caso na produção de plantas ornamentais e cultivo de híbridos (GEORGE, 2008).

Metodologias para a propagação *in vitro* de bromélias ornamentais têm sido revisadas por Mercier e Kerbauy (1997). Estudos recentes também foram realizados visando a propagação de *Cryptanthus sinuosus* (CARNEIRO et al., 1998), *Ananas comosus* (GUERRA et al., 1999; DAL VESCO et al., 2001) e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (ALVES; GUERRA, 2001).

Gemas laterais têm sido usadas com sucesso para a propagação *in vitro* de bromélias, sendo referidas por gemas laterais (PESCADOR; KOLLER, 1992; SILVA, 2005), protuberâncias (MERCIER; KERBAUY, 1992) ou brotações laterais (POMPELLI, 2002).

É comum a incorporação de uma ou mais citocininas ao meio de cultura para estimular o crescimento de gemas axilares. O cultivo de ramos contendo gemas axilares em meios de cultura suplementado com concentrações apropriadas de citocinina, induzem o surgimento de pequenos ramos nos explantes, após um período de 4 a 6 semanas em cultivo (GEORGE, 2008). No entanto, algumas espécies vegetais necessitam da presença de auxina e citocinina, numa proporção específica para que a indução da organogênese seja efetiva. Isto porque a concentração e a proporção desses fitorreguladores são determinantes para o controle do ciclo celular, divisão celular e diferenciação celular (GEORGE, 2008).

O sucesso do cultivo *in vitro* de plantas com fins propagativos é, em grande parte, influenciado pela natureza do meio de cultura utilizado. Para um crescimento saudável e vigoroso, as plantas precisam assimilar do meio nutritivo macro (nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio e enxofre) e micronutrientes (ferro, níquel, cloro, manganês, zinco, boro, cobre, molibdênio (MALAVOLTA, 1980). Juntamente com os macro e micronutrientes listados acima, carbono, oxigênio e hidrogênio constituem os elementos essenciais ao crescimento. A formulação de Murashige e Skoog (1962) é o meio de cultura mais comumente utilizado para o cultivo *in vitro*. Contudo, algumas espécies vegetais possuem exigências específicas quanto à composição do meio de cultura. Assim, adaptações podem ser feitas ao meio, de forma a proporcionar maior crescimento (RUGINI, 1984; EL BADAOUY et al., 1996; PULLMAN et al., 2003; BOUMAN; TIEKSTRA, 2005; NAS; READ, 2004; GONÇALVES et al., 2005).

A produção de bromélias para fins comerciais é recente em nosso país, carecendo de informações técnicas que possam promover o aumento da produtividade e qualidade.

## **7.2 OBJETIVO**

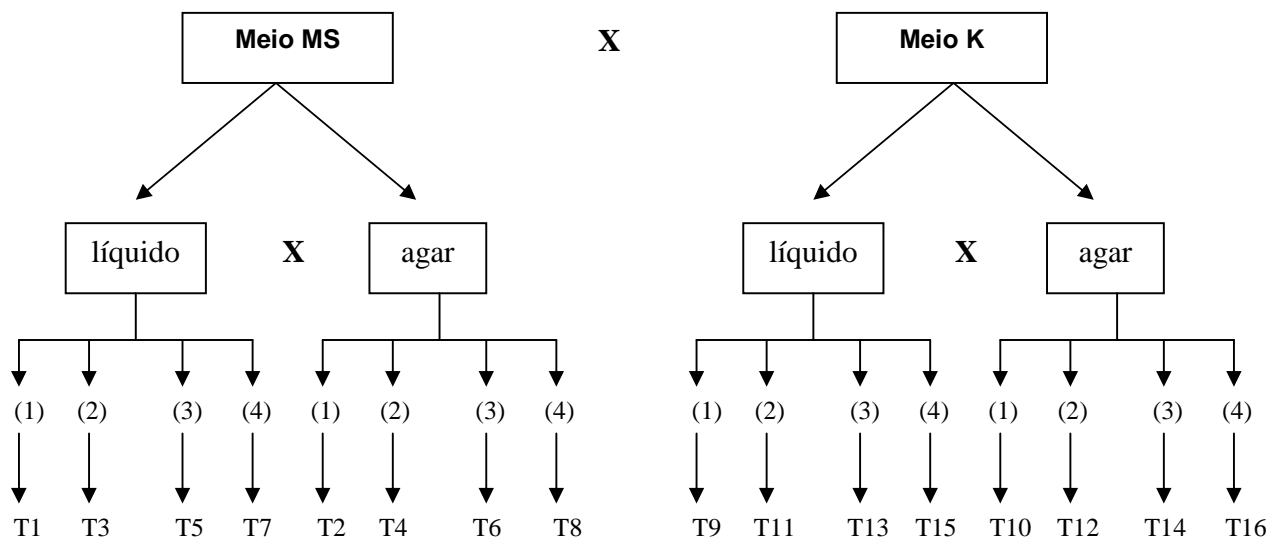
Estudar os efeitos de diferentes reguladores de crescimento, meios de cultura e estado físico do meio de cultura, visando à identificação da melhor combinação para a multiplicação in vitro de gemas laterais de *V. sucrei*.

### 7.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a indução de brotações laterais, foram selecionadas plântulas com seis meses de idade, medindo no mínimo 0,8 cm de altura, obtidas por meio da germinação *in vitro*. As plântulas foram transferidas para frascos de vidro contendo 10 mL do meio de cultura. Os tratamentos de indução de brotações laterais consistiram numa combinação fatorial (2x2x4) dos seguintes fatores:

- dois meios de cultura, Murashige e Skooge (1962) (MS) e Knudson (1946) (K);
- dois estados físicos do meio de cultura, líquido (explante suspenso sobre ponte de papel filtro) e gelificado com agar (6 g.L<sup>-1</sup>);
- quatro combinações de auxinas (AIA e ANA), citocininas (cinetina e BAP), e uma amina (adenina) em diferentes proporções: (1) 2 mg/L de AIA (ácido indolacético) + 2 mg/L de cinetina + 40 mg/L de adenina, (2) 0,5 mg/L de ANA (ácido naftalenoacético) + 1 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina) + 40 mg/L de adenina, (3) 1 mg/L de ANA + 1 mg/L de BAP + 40 mg/L de adenina e (4) 0,5mg/L de ANA + 2mg/L de BAP.

A combinação fatorial entre os fatores citados acima deram origem a 16 tratamentos (Figura 1).



Os meios MS e K foram acrescidos 30 e 20 g/L de sacarose respectivamente. Ao meio MS foi adicionado vitaminas de Gallo (1974) (Anexo 1). As concentrações de fitorreguladores utilizadas foram baseadas em sugestões de Fráguas et al. (2000?) e Mercier e Kerbauy (1992, 1994) que alcançaram resultados bastante satisfatórios na multiplicação de gemas laterais de espécies do gênero *Vriesea*. Os tratamentos consistiram de dez replicatas contendo uma plântula por frasco totalizando 160 plântulas. As plantas permaneceram nos tratamentos de indução por 120 dias. A renovação dos meios de cultura ocorreu aos 30 e 90 dias após o início da cultura.

O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,5 antes da autoclavagem, conforme sugestões de Droste e outros (2005). Todo o material de trabalho, incluindo água destilada, bisturis, pinças e outros instrumentos e vidrarias foram esterilizados em autoclave à 120°C, 1atm por 20 minutos.

As plântulas foram acondicionadas em salas de crescimento com temperatura ajustada para 25°C ( $\pm 2$ ), radiação de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12 horas luz.

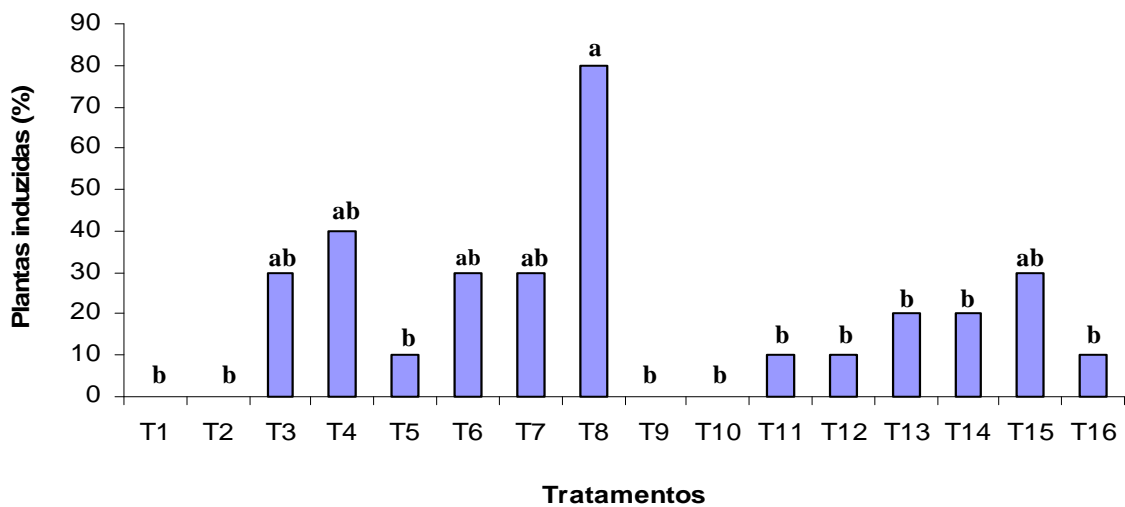
A eficiência da multiplicação das brotações laterais foi calculada pela porcentagem de plantas que geraram brotações laterais em cada tratamento e número médio de brotações produzidas por planta.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados de porcentagem de plantas com brotações laterais e o número de brotações por planta não seguiam distribuição normal. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a separação das medias foi realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis do programa ASSISTAT (versão 7.5 beta, 2008).

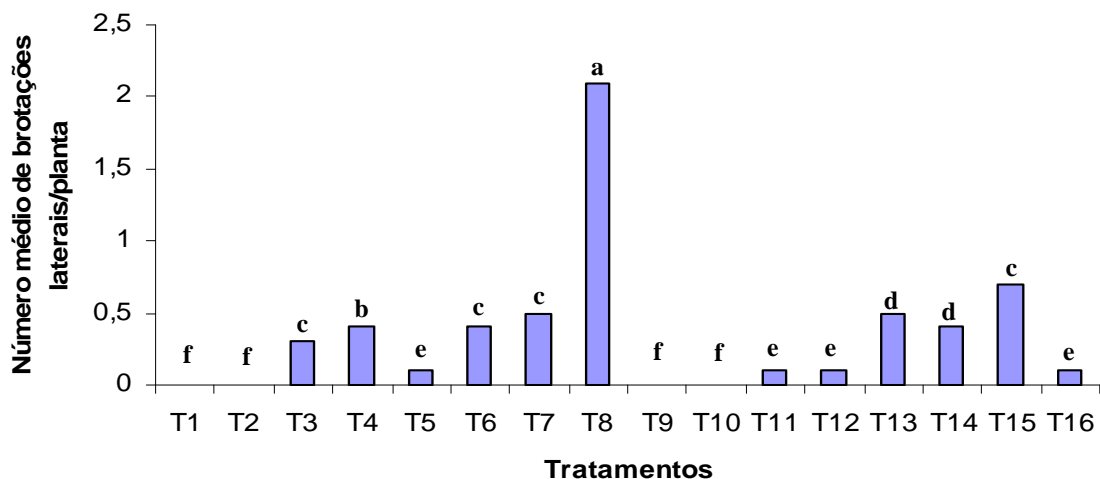
## 7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 mostra a porcentagem de plantas que apresentaram brotações laterais, após 120 dias de cultivo *in vitro*. O potencial de multiplicação, expresso pela porcentagem de plantas que produziram brotações laterais, variou de 0 a 80%. O tratamento MS líquido acrescido de 0,5 mg/L de ANA e 2,0 mg/L de BAP proporcionou a maior porcentagem de plantas induzidas com brotações laterais (80%). Este mesmo tratamento também apresentou o maior número de brotações por planta (Figura 3). No entanto, este foi considerado baixo (2,2 brotações/planta). De acordo com Hosoki e Asahira (1980), as bromeliáceas são relativamente difíceis de propagar devido ao seu crescimento lento. Um baixo número de brotações/planta também foi encontrado para diversas espécies de bromélias (DROSTE et al., 2005; PICKENS et al., 2006; SILVA et al., 2007; MENDES et al., 2007).

A concentração de 0,5 mg/L de ANA e 2,0 mg/L de BAP em associação com o meio K líquido apresentou valor significativamente menor de porcentagem de plantas induzidas (Figura 2) e de número de brotações por planta (Figura 3) em relação ao meio MS líquido com a mesma concentração de reguladores de crescimento. É possível que a presença de vitaminas no meio MS tenha contribuído para essa diferença. A adição em diferentes proporções das vitaminas tiamina, ácido nicotínico, piridoxina e mio-inositol do meio MS tem sido utilizado para a cultura de diversas espécies vegetais (GEORGE, 2008). Roest e Bokelmann (1975) obtiveram um incremento na formação de ramos adventícios em pedicelos de *Chrysanthemum* quando estes eram cultivados em meio MS acrescido de vitaminas.



**Figura 2** – Porcentagem de plantas que responderam à indução das brotações laterais após 120 dias de cultivo *in vitro* (n = 10). T1 = MS Agar (1); T2 = MS líquido (1); T3 = MS Agar (2); T4 = MS líquido (2); T5 = MS Agar (3); T6 = MS líquido (3); T7 = MS agar (4); T8 = MS líquido (4); T9 = K Agar (1); T10 = K líquido (1); T11 = K Agar (2); T12 = K líquido (2); T13 = K Agar (3); T14 = K líquido (3); T15 = K agar (4); T16 = K líquido (4). A diferença entre as médias foi analisada através do teste de Kruskal-Wallis. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa.



**Figura 3** – Numero de brotações laterais em plântulas *V. sucrei* após 120 dias de cultivo *in vitro*. T1 = MS Agar (1); T2 = MS líquido (1); T3 = MS Agar (2); T4 = MS líquido (2); T5 = MS Agar (3); T6 = MS líquido (3); T7 = MS agar (4); T8 = MS líquido (4); T9 = K Agar (1); T10 = K líquido (1); T11 = K Agar (2); T12 = K líquido (2); T13 = K Agar (3); T14 = K líquido (3); T15 = K agar (4); T16 = K líquido (4). A diferença entre as médias foi analisada através do teste de Kruskal-Wallis. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa.



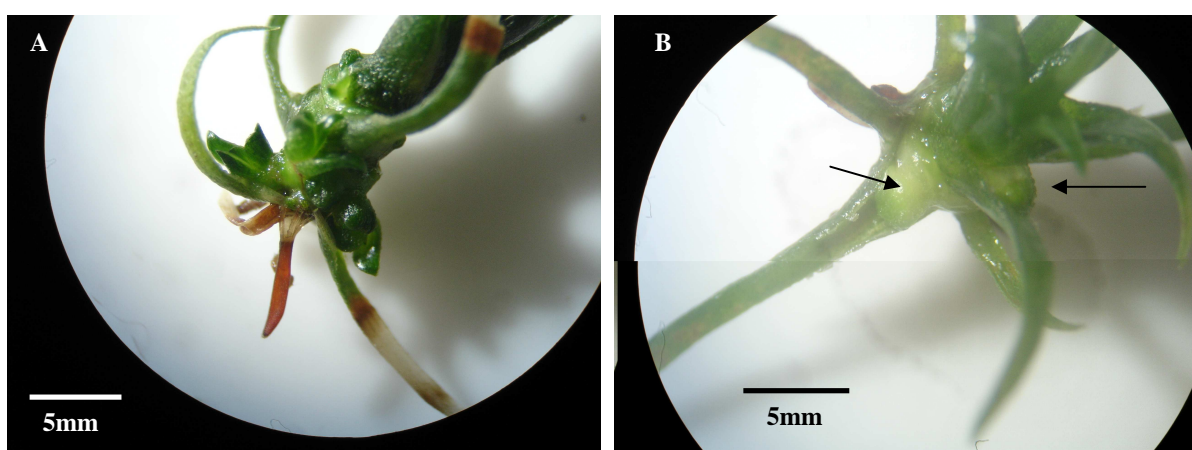
Os tratamentos contendo a combinação 2 mg/L de AIA, 2 mg/L de cinetina e 40 mg/L de adenina não apresentaram plantas com brotações laterais, independente do tipo de meio de cultura ou estados físico do meio utilizado (Figura 2). Os demais tratamentos contendo razões menores de citocinina/auxina deram origem a uma menor porcentagem de plantas induzidas (Figura 2) e menor número de brotações por planta (Figura 3).

Os tratamentos contendo meio MS tanto na forma líquida quanto gelificada tenderam a apresentar maiores porcentagens de plantas induzidas (Figura 2) e número de brotações por planta (Figura 3) em relação aos meios contendo meio K.

Estes resultados demonstram que uma maior razão citocinina/auxina (0,5 mg/L de ANA e 2,0 mg/L de BAP) acrescidas ao meio MS seria mais eficaz na indução da multiplicação; e que a adição de adenina não foi essencial. Em geral, sistemas de micropropagação de Bromeliaceae são baseados em meios de cultura suplementados com combinações de BAP e ANA para a indução de brotações (MERCIER; KERBAUY 1997). Droste e outros (2005) também utilizaram a concentração de 0,5 mg/L de ANA e 2 mg/L de BAP para indução da multiplicação de *Vriesea gigantea* e *Vriesea philippocoburgii*. Após 4 meses em cultura, foram alcançados 100% e 68% de plantas com brotações laterais para *V. philippocoburgii* e *V. gigantea* respectivamente. Contudo, o tipo de meio de cultura associado a esta combinação de reguladores de crescimento diferiu para ambas as espécies. Para *V. gigantea*, o meio MS líquido promoveu maior porcentagem de plantas com brotações laterais e maior número de brotações por planta. Para *V. philippocoburgii*, os meios K, K acrescido de micronutrientes do meio MS e K acrescido de vitaminas do meio MS resultaram em maior porcentagem de plantas com brotações laterais e maior número de brotações por planta. Pesquisas recentes que tiveram como enfoque aspectos fisiológicos de *V. gigantea* e *V. philippocoburgii* utilizaram meio K na sua concentração normal ou diluída (MERCIER et al., 1997; ENDRES; MERCIER, 2001; ENDRES et al., 2002; ENDRES; MERCIER, 2003). Para *Vriesea fosteriana*, uma maior proliferação de brotações laterais foram obtidas com a concentração de 1,6 mg/L de BAP e 0,6 mg/L de ANA.

Quanto ao estado físico do meio, a análise estatística não mostrou diferenças significativas para a porcentagem de plantas com brotações laterais (Figura 2). No entanto, se considerarmos somente os valores absolutos, maiores porcentagens de plantas com brotações laterais tendem a ocorrer nos meios líquidos.

O desenvolvimento de brotos laterais dispostos em grupamentos não ocorreu de maneira homogênea em nenhum dos tratamentos testados. Brotações laterais encontradas no mesmo agrupamento apresentavam diversos comprimentos, demonstrando que os grupos de brotos continuariam a se multiplicar (Figura 3A). As brotações laterais surgiram por meio de protuberâncias originadas na região basal das folhas (Figura 3B). Esta observação é relevante, visto que a morfogênese *in vitro* de bromélias esta normalmente associada à organogênese baseada na liberação das gemas axilares (CARNEIRO et. al., 1999). Em *Neoregelia cruenta* as protuberâncias também foram originadas na base das folhas de explantes cultivados em meio MS acrescido de 0,5 mg/L de ANA e 4 mg/L de BAP (CARNEIRO et. al., 1999). Para *Vriesea reitzii* Leme & Costa, estruturas similares a brotações laterais eram produzidas a partir da região basal das folhas de plântulas cultivadas em meio líquido suplementado com 0,1 mg/L de BAP e 0,05 mg/L de ANA (RECH-FILHO et. al., 2005).



**Figura 4** – Desenvolvimento de brotações laterais em plantas de *V. sucrei*, após 120 dias em cultura. **A.** brotações laterais com diferentes tamanhos numa mesma planta; **B.** surgimento de brotações laterais na região basal das folhas.

## **7.5 CONCLUSÕES**

- a) O tratamento MS líquido com a combinação 0,5mg/L de ANA e 2mg/L de BAP promoveu maior porcentagem de planta com brotação lateral e maior número de brotações laterais/planta;
- b) Todos os tratamentos testados geraram um número baixo de brotações laterais/planta.

## 7.6 REFERÊNCIAS

- ALVES, G.M.; GUERRA, M.P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **Journal of the Bromeliad Society**, v.51, n.5, p. 202–212, 2001.
- BOUMAN, H.; TIEKSTRA, A. Adaptations of the mineral composition of tissue culture media on the basis of plant elemental analysis and composition of hydroponic substrates. In: Hvoslef-Eide, A.K. and Preil W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht, p. 493-505, 2005.
- CARNEIRO, L.A.; CANDIDO, M.S.D.; ARAUJO, R.F.G.; FONSECA, M.H.P.B.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae, species from Rio de Janeiro, Brazil. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v.4, p.153–158, 1999.
- CHAMAS, C. C.; MATTHES, L. A. F. Método de levantamento de espécies nativas com potencial ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 6, p. 53-63, 2000.
- 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**, v.56, p.143–154, 2001.
- DROSTE, A.; SILVA, M.A.; MATOS, V.A.; ALMEIDA, W.J. In vitro Culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two Vulnerable Bromeliads Native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.5, p.717-722, 2005.
- EL BADAQUI, H.; MORARD, P.; HENRY, M. Stimulation of the growth and solamargine production by *Solanum paludosum* multiple shoot cultures using a new culture medium. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 45, p.153-158, 1996.
- ENDRES, L.; MERCIER, H. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **J. of Plant Physiol.**, v.158, p.205-212, 2001.
- ENDRES, L.; SOUZA, B. M.; MERCIER, H. In vitro nitrogen nutrition and hormonal pattern in bromeliads. **In vitro Cel. and Dev. Biol. - Plant**, v.38, p.481-486, 2002.
- ENDRES, L.; MERCIER, H. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated in vitro. **Plant Physiol. and Biochem.**, v.41, p.181-187, 2003.
- FEVEREIRO, P.M.; CAETANO, V.H.; SANTOS, G.M. **Cadernos didáticos de Ciências**, vol 1. Lisboa: Ministério da Educação, DES, EEC, 2001.
- FRAGUAS,
- GEORGE, F. E.; HALL, A. M.; JAN DE KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3 ed. V. 1, Springer, p.360, 2008.
- GONÇALVES, S.; CORREIA, P.J.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A.; ROMANO, A. A new medium formulation for in vitro rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentration. **Biol. Plant**, v.49, p.277-280, 2005.

- HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience**, v.15, 603-604, 1980.
- KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (BAKER) L.B. SMITH *in vitro***. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2005.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, 14, p. 214-217, 1946.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronomica Ceres, 251p., 1980.
- MELLO, T.B. As bromélias no paisagismo. **Bromelia**, n.1, v.3, p.3-7, 1996.
- MENDES, G.C.; SOARES, C.Q.G.; BRAGA, V.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae), **Revista Brasileira de Biociência**, v.5, p.972-974, 2007.
- MERCER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesia fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, V.30, p. 247-249, 1992.
- MERCIER, H. and KERBAUY, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. **J. Bromeliad**, v. 44, p. 120-124, 1994.
- MERCIER, H.; KERBAUY G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: Bajaj Y.P.S. (ed.), **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 40, High-Tech and Micropropagation VI. Springer-Verlag, Berlin, pp. 43–57. 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NAS, M.N.; READ, P.E. A hypothesis for the development of a defined medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. **Sci. Hortic**, n.101, p.189-200, 2004.
- PASTORE, J. Flores, tecnologia e emprego. **Jornal da Tarde**, 18 fev. 2004.
- PESCADOR, R.; KOLLER, O. C. Propagação “*in vitro*” do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Pérola. **Rev. Bras. Frut.**, Cruz das Almas, v.14, n.2, p.1-4, 1992.
- PICKENS, K. A.; AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y.; WOLF, J. H. D. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. **HortScience** v.38, p.101–104, 2003.
- POMPELLI, M. F. Morfogênese *in vitro*, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachia* Hassler. 2002 93f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- PULLMAN, G.S.; MONTELLO, P.; CAIRNEY, J.; XU, N.; FENG, X. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. **Plant Science**, v.164, p.955-969, 2003.

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**, v. 14, p. 1799-1808, 2005.

ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. **Scien. Hortic.** v.3, p.317-330, 1975.

RUGINI, E. In vitro propagation of some olive (*Olea europea sativa* L.) cultivars with different rootability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Sci. Hortic**, n. 24, p.123-124, 1984.

SILVA, A. L. L. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. 2005 44f. **Monografia** (Especialização em Biologia) – Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

TOMBOLATO, A.F.C.; BOERSEN, A.; COUTINHO, L; LOURENÇÃO, A.L.; ALEXANDRE, M.A.V. Cultivo comercial de alstroméria. **Revista Brasileira de Horticulura Ornamental**, v.6, p. 1-13, 2000.

## ANEXOS

**Anexo 1** – Protocolo utilizado para a preparação de um litro de meio nutritivo Murashige e Skooge (1962).

<b>Macronutrientes/ Micronutrientes</b>	<b>Concentração Final (mg)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650,0
KNO <sub>3</sub>	1.900,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.000,0
KI	830,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	250,0
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.000,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.000,0
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.300,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	25,0
Na <sub>2</sub> EDTA	37.250,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.850,0
<b>Vitaminas *</b>	<b>g/L</b>
TIAMINA – HCl	1,0
PIRIDOXINA-HCl	0,5
ÁCIDO NICOTÍNICO	0,5
GLICINA	2,0
<b>Açúcares</b>	<b>g/L</b>
SACAROSE	30,0
INOSITOL	0,1
<b>Gelificante</b>	<b>g/L</b>
ÁGAR	6,0

\* Vitaminas de Gallo (1974).

**Anexo 2** – Protocolo utilizado para a preparação de um litro de meio nutritivo Knudson (1946).

<b>Macronutrientes/ Micronutrientes</b>	<b>Concentração Final (mg)</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1000,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25,0
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	7,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,056
MoO <sub>3</sub>	0,016
CuSO <sub>4</sub>	0,04
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,331
<b>Açúcar</b>	<b>g/L</b>
SACAROSE	20,0
<b>Gelificante</b>	<b>g/L</b>
ÁGAR	6,0

