

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*
DE BROMÉLIA IMPERIAL**
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms

VANESSA COELHO NAVES

.93422

89

2001

52589

MIN 37213

VANESSA COELHO NAVES

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BROMÉLIA IMPERIAL

Alcantarea imperialis (Carrière) Harms

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profa. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



52589

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2001

BIBLIOTECA CENTRAL

UFLA

N.º CLAS. T. 635.93422

NAV

N.º REGISTRO 52589

DATA 11 / 12 / 01

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Naves, Vanessa Coelho

Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière)
Harms. -- Lavras : UFLA, 2001.

76 p. : il.

Orientadora: Patricia Duarte de Oliveira Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Bromélia imperial. 3. *Alcantarea imperialis*. 4.
Germinação de semente. 5. Propagação *in vitro*. 6. Aclimatização. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.93422

VANESSA COELHO NAVES

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BROMÉLIA IMPERIAL

Alcantarea imperialis (Carrière) Harms

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

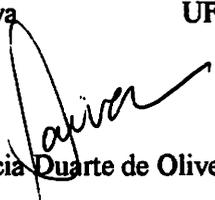
APROVADA em 21 de setembro de 2001

Prof. Moacir Pasqual

UFLA

Prof. Luciano Vilela Paiva

UFLA


Prof. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS-BRASIL

*À brava gente brasileira, que luta e trabalha por um país melhor com
oportunidades para todos.*

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai, Benedito Teixeira Naves, pelo apoio em todas as etapas da minha vida e por mais esta vitória.

À minha mãe, Maria Helena Coelho, pelo constante carinho e dedicação com que acompanhou meu trabalho.

Aos meus irmãos Liliana e Leandro, e a todos que sempre acreditaram em mim.

À Profa. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva pela oportunidade de participar dos seus conhecimentos e pela atenção nos momentos críticos.

Ao Prof. Moacir Pasqual pela disponibilidade do Laboratório de Cultura de Tecidos – UFLA, onde foram feitos esses e muitos outros ensaios, por ele orientados.

Aos funcionários do Laboratório, Vantuil Antônio Rodrigues e Antônio Clarete de Oliveira, pela ajuda nos ensaios, pelo companheirismo e pelo agradável ambiente de trabalho.

A Marcelo Tadeu Sampaio, pelo apoio na montagem e avaliação dos ensaios.

Ao Prof. Silvério José Coelho, pelo incentivo no trabalho com bromélias.

Ao amigo, Prof. Antônio Marciano da Silva, pela orientação e disponibilidade em todos os momentos.

À Taciana pela atenção e apoio nas análises estatísticas e a Luiz Carlos Coelho, pelas fotos dos experimentos.

A Carlos Rogério Coelho, e todos os funcionários da Biblioteca Central da UFLA, pelo apoio nas inúmeras horas de pesquisa.

Aos amigos e colegas de mestrado, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração durante o curso.

Aos meus colegas de trabalho do Parque Zoobotânico de Pouso Alegre que me substituíram quando das minhas ausências em favor deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

BIOGRAFIA

VANESSA COELHO NAVES, filha de Benedito Teixeira Naves e Maria Helena Coelho, nasceu em 07 de julho de 1972, em Lavras, MG. Coursou o ensino fundamental e segundo grau em Pouso Alegre, MG. Em março de 1991, iniciou o curso de graduação em Agronomia na Escola Superior de Agricultura de Lavras. Bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, entre 1995 e 1996 em seu trabalho de propagação de várias espécies da família Bromeliaceae. Concluiu a graduação em janeiro de 1997, ingressando num programa de aperfeiçoamento na Universidade Federal de Lavras, também como bolsista da FAPEMIG. Em maio de 1999, iniciou o curso de Mestrado pela UFLA em Agronomia-Fitotecnia com ênfase em Paisagismo e Floricultura, desenvolvendo esse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Características gerais e importância ecológica das bromélias.....	3
2.2 Importância econômica.....	5
2.3 Propagação convencional.....	7
2.4 Propagação <i>in vitro</i>	9
2.4.1 Meios de cultura.....	10
2.4.2 Reguladores de crescimento.....	12
2.4.3 Desinfecção dos explantes.....	15
2.4.4 Aclimatização.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local.....	17
3.2 Material vegetal.....	17
3.3 Experimentos.....	19
3.3.1 Germinação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>Alcantarea imperialis</i>	19
3.3.2 Avaliação de diferentes meios de cultura para o desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Alcantarea imperialis</i>	20
3.3.3 Efeito de BAP e ANA sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> de brotos de <i>Alcantarea imperialis</i>	21
3.3.4 Efeito de TDZ e ANA sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> de brotos de <i>Alcantarea imperialis</i>	21
3.3.5 Avaliação do efeito de ANA sobre a indução de enraizamento em brotos de <i>Alcantarea imperialis</i>	22
3.3.6 Aclimatização.....	23

3.3.7 Análises estatísticas.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Germinação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de sementes.....	24
4.2 Avaliação de diferentes meios de cultura para o desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Alcantarea imperialis</i>	28
4.2.1 Explantes responsivos	30
4.2.2 Número de brotações.....	32
4.2.3 Altura média de brotos.....	34
4.2.4 Entumescimento.....	36
4.2.5 Altura média do explante inicial.....	38
4.3 Efeitos dos reguladores de crescimento BAP e do TDZ associados ao ANA sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> de brotos de <i>Alcantarea imperialis</i>	40
4.3.1 Explantes responsivos.....	43
4.3.2 Número de brotações.....	45
4.3.3 Altura dos brotos formados.....	48
4.3.4 Entumescimento.....	50
4.3.5 Ocorrência de calos.....	53
4.3.6 Altura média do explante inicial.....	55
4.3.7 Enraizamento.....	57
4.4 Efeito do ANA sobre o enraizamento de brotos de <i>Alcantarea imperialis</i> cultivados <i>in vitro</i>	59
4.5 Aclimatização.....	62
5 CONCLUSÕES.....	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS.....	72

RESUMO

NAVES, V.C. Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Lavras: UFLA, 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

O grande valor das bromélias como plantas ornamentais gera a necessidade do desenvolvimento de técnicas para sua propagação, de forma a evitar a coleta de espécimes do ambiente natural, os quais são cada vez mais raros. A bromélia imperial, *Alcantarea imperialis*, de ocorrência natural na região da Serra do Mar na Região Sudeste, é um exemplo típico de espécie ameaçada de extinção em consequência do extrativismo. Nesse contexto, com este estudo objetivou-se estabelecer um protocolo para propagação *in vitro* dessa espécie. Como explantes, foram usadas sementes inoculadas *in vitro* para avaliar algumas características de germinação e compará-las à germinação *in vivo*. Ficou estabelecido que a germinação *in vitro* é mais rápida e eficiente, com bons resultados em meio MS sólido a 75% da sua composição original, com um tempo de germinação de 16 dias e 98% das sementes germinadas. As plântulas foram inoculadas nos meios de cultura MS e Knudson a 50%, 100% e 150% de suas composições originais para se estabelecer o meio ideal de propagação. O melhor resultado foi obtido com a composição original do meio MS sólido. Estabelecido o meio de cultura ideal, os explantes foram cultivados em meio MS contendo BAP e TDZ associados a ANA para indução de brotações. Os melhores resultados foram obtidos com a associação de TDZ a 0,02 mg.L⁻¹ e ANA a 0,10 mg.L⁻¹, com regeneração média de 3,18 brotações por explante. Os brotos obtidos foram transferidos para MS suplementado com ANA nas concentrações 0,0, 0,5, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ para induzir o enraizamento que antecede o processo de aclimatização. Nessa fase do protocolo, foi estabelecida como ideal a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de ANA. O número de brotações obtido *in vitro* foi considerado expressivo, uma vez que essa espécie não emite brotações laterais em seu estado natural. Testou-se a aclimatização de brotos com e sem raiz, em casa-de-vegetação, cultivando em substrato Plantmax®, e avaliou-se o pegamento dos brotos, que foi de 98% para os brotos enraizados e 72% para os brotos sem raízes. Considera-se o protocolo desenvolvido uma alternativa de produção de mudas para o mercado de plantas ornamentais e programas de reintrodução em ambientes degradados.

Comitê Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Orientadora) e Moacir Pasqual – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

NAVES, V.C. *In vitro* propagation of imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Lavras: UFLA, 2001. 76p. Dissertation thesis (Master degree in Agronomy – Plant Science) – Universidade Federal de Lavras/MG.

The great value of their bromeliads as ornamental plants generates the need to develop techniques for propagation, avoiding the collection of specimens in the natural areas, more and more rare. The imperial bromeliad (*Alcantarea imperialis*), native to Serra do Mar, is a typical example of species threatened of extinction due to the extraction. In this context, this study aimed to establish a protocol for *in vitro* propagation of this species. As explants, seeds inoculated *in vitro* were used, to determine some germination characteristics and to compare them to the *in vivo* germination. It was established that the *in vitro* germination is faster and efficient, with good results in solid MS medium at 75% of its original composition. The seedlings were inoculated in the MS and Knudson culture mediums at 50%, 100%, and 150% of its original compositions to the ideal propagation medium. The best result was obtained with the original composition of the MS solid medium. Established the ideal culture medium, the explants were cultivated in MS medium containing BAP and TDZ, associated with ANA for shoot induction. The best results were obtained with the association of 0.02 mg.L⁻¹ TDZ and 0.10 mg.L⁻¹ ANA, with regeneration of 3.18 shoots per explant. The shoots were transferred for MS medium supplemented with ANA at the concentrations of 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹ to induce root formation before acclimatization to *ex vitro* conditions. In this phase of the protocol, the ANA concentration, 0.5 mg.L⁻¹, was established as ideal. The number of plants obtained was considered expressive, once this species does not give out lateral shoots in its natural state. The acclimatization of the shoots were tested using shoots with or without root, in greenhouse, cultivating in Plantmax®, the survival of the shoots was evaluated, which was 98% in the rooted shoots and 72% in the shoots without a root. The developed protocol, is considered, an alternative to production of seedlings for the market of ornamental plants and reintroduction programs in degraded areas.

Guidance committee: Patricia Duarte de Oliveira Paiva - UFLA (Adviser) and Moacir Pasqual - UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

As Bromeliaceas são plantas que impressionam por suas formas exóticas e pela ampla gama de cores e variedade de suas flores e folhas. Possuem grande valor para arranjos e vasos de interior e ocupam sempre lugar de destaque em projetos paisagísticos. ^{conclusão} A valorização do uso das bromélias leva a acreditar no potencial brasileiro de se tornar um grande exportador dessas plantas, tão cobiçadas em outros continentes.

O paisagista Roberto Burle Marx foi pioneiro na valorização das bromélias como plantas ornamentais, as quais sempre estavam presentes em seus jardins. Foi também responsável pela descoberta de novas espécies, muitas das quais fazem referência ao seu nome.

Além da importância ornamental, as bromélias apresentam também importante papel na ecologia de vários ambientes, servindo como alimento e local de proteção para muitos animais, atuando como reservatórios de água em ambientes mais secos e, pela decomposição de suas folhas, proporcionam formação de solo viável para sobrevivência de espécies vegetais mais exigentes.

A falta de informações específicas sobre técnicas de propagação e cultivo tem desestimulado a produção de bromélias, sendo, muitas vezes, as espécies oferecidas para comercialização provenientes de extrativismo. Em muitos casos, essas espécies são retiradas de populações com poucos representantes, como é o caso da *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, que ocorre em campos de altitude, e por ser amplamente utilizada em projetos paisagísticos, vem sendo alvo do extrativismo. Apesar de produzir sementes em abundância e com alta viabilidade, não é capaz de emitir brotações laterais, como a maioria das plantas dessa família.

Além do extrativismo, essas plantas sofrem com a destruição de seus ambientes. A exploração imobiliária, a construção de avenidas e rodovias, a exemplo da Linha Vermelha e o avanço das fronteiras agrícolas, suprimem cada vez mais o hábitat dessas plantas, aumentando a necessidade de se desenvolver meios mais eficientes de se propagar bromélias.

Na natureza, assim como em pequenos viveiros onde são cultivadas, as bromélias se propagam bem por meio de sementes, pois geralmente produzem grande quantidade dessas estruturas. Porém, esse tipo de propagação é muito lento. Algumas espécies, dentre elas a *Alcantarea imperialis*, podem levar até cinqüenta anos para atingir a idade adulta em seu ambiente natural. No cultivo em viveiros, esse tempo é reduzido para 4 anos.

Outra maneira comum de propagação é através da emissão de brotações laterais ou afilhos, uma forma natural de propagação vegetativa, comum entre as bromélias. No entanto, o número dessas brotações produzidas por planta é geralmente pequeno, não sendo suficiente para suprir o mercado crescente. No caso da *Alcantarea imperialis*, essa situação é ainda mais crítica, pois essa espécie produz pequeno número de afilhos somente na fase inicial da muda, cessando essa produção após o primeiro ano de cultivo.

A utilização da técnica de cultura de tecidos é uma importante forma de propagação, permitindo a produção de plantas em larga escala, num período reduzido de tempo e proporcionando maior uniformidade e qualidade das mudas em relação aos métodos convencionais. No Brasil, já existem laboratórios dedicados à produção comercial de bromélias, atendendo o mercado interno e para exportação.

Em função disso, objetivou-se neste trabalho o desenvolvimento de um protocolo para propagação *in vitro* da bromélia imperial (*Alcantarea imperialis*), utilizando como explantes iniciais sementes, visando à otimização do processo de micropropagação para produção de mudas. Enfatiza-se também que, mediante um

protocolo com alta eficiência de regeneração, tem-se a possibilidade da comercialização de mudas, diminuindo e desestimulando o extrativismo e aumentando a popularização dessa espécie, podendo ser usada até mesmo em projetos de reintrodução em área degradadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais e importância ecológica das bromélias

As bromélias são plantas de ocorrência exclusiva nas Américas. Atualmente existem classificados 50 gêneros de Bromeliaceae, que apresentam mais de 3000 espécies, sendo aproximadamente a metade encontrada exclusivamente no Brasil. Ocupam ambientes desde o nível do mar até altitudes superiores a 4.000 metros; em termos climáticos sobrevivem tanto nas zonas desérticas, como nas mais úmidas, e resistem até a temperaturas próximas de 0° C (Leme e Marigo, 1993).

A Família Bromeliaceae é dividida em três Subfamílias, baseando-se em características florais e na morfologia dos frutos e sementes:

- a. *Pitcarnioideae* – plantas terrestres ou rupícolas, de folhas epinecentes, frutos secos (cápsulas) e sementes geralmente aladas. Estas plantas vivem junto aos cactus e agaves, em pleno sol;
- b. *Bromelioideae* – Terrestres ou epífitas, com folhas serrilhadas, denteadas ou com espinhos nas margens. Os frutos podem ser secos (cápsulas) ou carnosos (bagas) e são cultivadas tanto em jardim quanto em vasos. Algumas formam com as folhas um depósito para captação de água, como uma cisterna. As

epífitas vivem em matas pluviais ou em ambientes com alta umidade relativa do ar;

c. *Tillandsioideae* – na maioria, são epífitas, com folhas de margens lisas, sem espinhos ou dentes; os frutos são secos e as sementes apresentam uma coroa de pêlos longos que as auxiliam na dispersão pelo vento (Kampf, 1992).

As bromélias são classificadas como plantas monocárpicas perenes, ou seja, durante o ciclo vital, que pode variar de alguns meses a muitos anos, de acordo com a espécie e/ou condições ambientais, o indivíduo floresce e frutifica somente uma vez. A propagação vegetativa, isto é, emissão de brotações laterais formando grandes touceiras é uma estratégia comum na família, havendo poucas exceções de espécies que não possuem essa capacidade (Cândido, 1996).

As raízes são quase sempre reduzidas estrutural e funcionalmente (Braga, 1977). Podem servir tanto para absorção de água e nutrientes como para fixação ao substrato. Todas as espécies apresentam caule bastante curto e densamente coberto por folhas dispostas em espiral, formando uma roseta. As folhas costumam apresentar bainha, sendo providas de pêlos escamosos que absorvem nutrientes. A consistência da folha é variável, assim como a sua cor e o tamanho, variando de acordo com a intensidade luminosa. As flores são hermafroditas na maioria dos casos, com brácteas muito coloridas, e sua corola pode ser branca, vermelha, amarela, amarelo-esverdeada, azul ou violácea (Reitz, 1983).

As bromélias são consideradas essenciais para a garantia da diversidade nos locais onde ocorrem. Sua roseta tipo tanque em algumas espécies forma um micro-habitat para diversos grupos de organismos, o que lhes confere um importante papel ecológico (Oliveira, Rocha e Bangnal, 1994). Além disso, muitas são consideradas como espécies pioneiras, ao longo da sucessão ecológica, pois vão se entouceirando através da propagação vegetativa e a decomposição da touceira forma solo fértil para o desenvolvimento de plantas

mais exigentes. Outras espécies são rupículas, vivendo entre as rochas, ou epífitas, podendo localizar-se desde a base até o topo das árvores (Leme e Marigo, 1993).

Pertencendo à subfamília *Tillandsioideae*, a *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (= *Vriesea imperialis* V. L. Harms) é considerada a imperatriz das montanhas do Estado do Rio de Janeiro, onde ocorre principalmente nas escarpas rochosas íngremes, em grandes grupamentos populacionais (Smith e Downs, 1977). A planta pode reter entre suas bainhas vários litros de água e sua inflorescência pode atingir mais de três metros de altura. Para atingir seu porte majestoso, necessita de algumas décadas. A lentidão de seu desenvolvimento decorre da pequena quantidade de nutrientes disponíveis nesse ecossistema, em que a planta não pode contar, num curto espaço de tempo, com a apreensão pela roseta de boa quantidade de acúmulos orgânicos, como acontece nos ambientes florestais. Porém, essa deficiência nutricional pode ser suprida com adubação no cultivo comercial, o que diminui o seu ciclo (Leme e Marigo, 1993).

A Serra dos Órgãos (RJ) é uma das principais áreas de extrativismo de bromélias, caso específico de *Alcantarea imperialis*, pois corresponde à área de distribuição natural da espécie, sendo, portanto, considerada área de risco (Nunes e Forzza, 1998)

Há risco iminente de extinção para a *Alcantarea imperialis*, já que a espécie pode levar mais de 20 anos para atingir a maturidade, quando então é arrancada do seu hábitat (Wanderley, 2001).

2.2 Importância econômica

A importância econômica das bromélias tem crescido muito nos últimos anos, com sua utilização em projetos paisagísticos por causa de sua grande beleza, resistência e praticidade no manuseio. As bromélias são utilizadas tanto

na decoração de jardins, como em interiores e hoje já podem ser encontradas à venda na maioria das floriculturas. A exportação é uma atividade bastante expressiva para colecionadores e comerciantes distribuídos por todo mundo, o que incentiva a coleta ilegal de espécies de maior beleza, acarretando a redução de populações naturais e o aumento do número de espécies em risco de extinção (Melo, 1996)

Nos Estados Unidos, o grande interesse pelas bromélias foi demonstrado com a fundação da Bromeliad Society International em 1950, com sede em Orlando (Flórida), o que estimulou o surgimento de organizações semelhantes em várias partes do mundo. No Brasil, foi criada a Sociedade Brasileira de Bromélias (SBB), sediada no Rio de Janeiro, que reuniu interessados na coleção e estudo dessas plantas.

Em cultivo comercial, algumas espécies de *Tillandsia*, *Vriesea* e *Guzmania* apresentam destaque entre as dez plantas mais comercializadas na Europa na década de 80, conforme a Bolsa de Flores de Aalsmeer, na Holanda (Kampf, 1992).

A exemplo de outros países, já existem no Brasil empresas que se dedicam exclusivamente à produção massal de mudas de bromélias para fins ornamentais, utilizando-se técnicas de cultura de tecidos, visando a abastecer mercados internos e externos (Zoming, 1996).

Os principais produtores de bromélias encontram-se nos municípios de Campinas (Rolf Bromélias), Holambra (Eco Flora) e Rio de Janeiro (Mania de Bromélias). O número total de produtores é completamente desconhecido, pois esse contingente pode ser composto por um grande número de pequenos produtores e comerciantes espalhados por todo território nacional. Os principais centros de comercialização são o CEAGESP (SP) e Guaratiba (RJ), onde são comercializadas bromélias provenientes do extrativismo e de produtores (Nunes e Forzza, 1998).

Segundo Wanderley (2001), a produção em estufas de *Alcantarea imperialis* ainda é muito pequena e muitos dos exemplares comercializados são retirados de seu ambiente natural e vendidos ilegalmente, devendo-se adquirir bromélias somente de produtores e vendedores credenciados pelo IBAMA.

2.3 Propagação convencional

As bromélias podem ser propagadas de forma sexuada ou assexuada. O processo sexual envolve a formação de sementes, das quais pode-se obter grande quantidade de plântulas (Rauh, 1990). Estas são geralmente pequenas, com 1 a 7 mm de comprimento, e os frutos necessitam de 6 a 12 meses para amadurecer. A viabilidade pode ser mantida durante vários meses; porém, estudos já demonstraram que os melhores resultados foram obtidos quando a sementeira foi feita logo após a colheita (The Bromeliad Society, 1977). O período de germinação varia com a espécie, ocorrendo entre 1 a 3 semanas. No caso de muitas espécies dos gêneros *Pitcairnia*, *Vriesea*, *Billbergia*, *Aechmea* e *Neoregelia*, a frequência de germinação foi alta quando essas foram dispostas em várias condições de luz e temperatura (Mercier e Guerreiro, 1990). Algumas espécies, no entanto, apresentam problemas na germinação em consequência pequeno número de sementes produzidas ou das condições nutricionais do meio.

A propagação sexuada de bromélias apresenta várias limitações, como a demora na maturação de sementes, que pode ocorrer em até um ano após a polinização. Além disso, plantas oriundas de sementes requerem, dependendo da espécie, de 3 a 8 anos para o florescimento (The Bromeliad Society, 1977). As sementes podem ainda ser freqüentemente atacadas por fungos, exigindo baixa umidade para germinação (Benzing, 1980).

O substrato para germinação pode ser algum tipo de musgo, imitando a situação natural, em que as raízes encontram a aeração necessária (Quinn, 1990).

No Brasil, a experiência de Roberto Menescal (Novaes, 1993) propõe a germinação das sementes em placas de xaxim, mantidas sob umidade controlada.

Dosolto (2001) afirma que a *Alcantarea imperialis* é propagada facilmente por sementes, muito numerosas, produzidas num período de floração que dura 5 meses. Quando semeadas em substrato formado por turfa e areia, levam de 20 a 30 dias para germinar.

A propagação assexuada de bromélias é realizada por meio das brotações laterais, que ocorrem em quase todas as espécies após o período de floração, quando a matriz entra em senescência. As brotações podem surgir nas gemas axilares das folhas ou a partir de estolões, podendo sobreviver independentemente ao atingirem aproximadamente um terço do tamanho da roseta original. Essas brotações podem ser facilmente enraizadas se forem destacadas e colocadas em mistura de solo apropriada. Quando a primeira brotação é removida, quebra-se a dormência de outras gemas axilares, levando a planta-mãe a emitir vários filhos antes de entrar em senescência (Wall, 1988).

No caso específico da *Alcantarea imperialis*, a brotação lateral só ocorre na fase jovem de desenvolvimento, havendo a emissão de um ou dois brotos, os quais geralmente não se desenvolvem. Por isso, na natureza, essa espécie nunca é encontrada na forma de touceiras, e sim como indivíduos isolados, sendo sua propagação realizada mediante numerosas sementes produzidas.

A propagação assexuada tem as vantagens de evitar a variabilidade genética inerente aos processos sexuais, além de as plantas obtidas apresentarem florescimento mais precoce em relação às obtidas por sementes (The Bromeliad Society, 1977). Apesar disso, o número de filhos formados pela planta-mãe é baixo, o que diminui consideravelmente a taxa de multiplicação (Kampf, 1992).

Segundo Jimenez e Caballero (1990), a propagação vegetativa resulta em altos custos na manutenção de matrizes, sendo recomendado que a

reprodução de bromélias em escala comercial seja feita via sementes ou por técnicas *in vitro*.

A cultura de tecidos é a principal forma de obtenção de plântulas de bromélias em escala comercial. A semeadura é utilizada apenas para selecionar matrizes a partir de híbridos ou de espécies naturais nativas ou exóticas (Nunes e Forzza, 1998).

2.4 Propagação *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial. O princípio básico da cultura de tecidos é a denominada "totipotencialidade" das células (Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997), que é a capacidade que possuem as células somáticas vegetais de, em condições adequadas, voltarem a dividir-se, sofrendo desdiferenciação, seguida de rediferenciação em outros tipos celulares, regenerando, então, uma planta completa (Grattaplaglia e Machado, 1990).

Para o setor de floricultura, as técnicas de cultura de tecidos vêm sendo amplamente utilizadas para a propagação clonal de um grande número de espécies, pois a multiplicação é rápida e a qualidade, uniformidade e quantidade de plantas produzidas são maiores em relação às obtidas por métodos convencionais (Gatti, 1992). Segundo Mercier e Kerbauy (1995), a taxa de multiplicação de bromélias *in vitro* é geralmente muito superior àquela conseguida *in vivo*.

Os primeiros trabalhos com bromélias iniciaram na década de 70. Jones e Murashige (1974), utilizando pontas de raízes inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com os reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e AIB (ácido indol-3-butírico),

conseguiram o desenvolvimento *in vitro* da espécie *Aechmea fasciata*. Esse método foi testado em outros 19 gêneros de Bromeliaceae, tendo sido obtido regeneração de *Ananas comosus*, *Cryptanthus bividatus* e *Cryptanthus start*. Com base nesse trabalho, outros pesquisadores têm se dedicado ao estabelecimento de protocolos para regeneração e propagação *in vitro* de diversas espécies de Bromeliaceae, com a utilização de diferentes explantes e combinações de reguladores de crescimento.

O sucesso do estabelecimento da cultura de células, órgãos ou tecidos *in vitro* depende, em geral, da seleção do explante, das condições de temperatura e luminosidade em que a cultura é mantida e do uso de um meio de cultura apropriado (Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997).

2.4.1 Meios de cultura

Na natureza, as bromélias absorvem água e nutrientes principalmente pela parte aérea, especialmente adaptada para esse fim por causa da formação de tanques que armazenam detritos orgânicos e pêlos absorventes presentes nas folhas, que são denominados tricomas foliares. Entretanto, muitas bromélias epífitas, quando cultivadas em vaso, podem absorver esses nutrientes através do sistema radicular. Essa capacidade, no entanto, é variável entre as espécies (Kampf, 1995).

Quando essas plantas são submetidas a condições de cultivo *in vitro*, suas raízes têm de apresentar obrigatoriamente a função de nutrição da planta, pois o meio de cultura constitui a única fonte disponível de nutrientes para sua sobrevivência. Assim, a escolha de um meio de cultura ideal e em uma concentração adequada é de fundamental importância no cultivo *in vitro*, pois a quantidade de nutrientes disponível pode afetar consideravelmente não só o desenvolvimento, como também a taxa de multiplicação dos explantes. Uma das

propriedades do meio de cultura é suprir a planta com os nutrientes necessários para o crescimento dos explantes.

Estudos de formulações e modificações na composição de meios de cultura realizados no laboratório do Prof. Skoog culminou em 1962 numa publicação sobre sais orgânicos necessários para cultura de tecidos de tabaco, denominado MS (Murashige e Skoog, 1962). Esse constitui o meio de cultura mais utilizado em trabalhos de cultura de tecidos (Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997).

Jones e Murashige (1974) conseguiram induzir brotações nas espécies *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, *Cryptanthus bivittatus* (Regal), *Dyckia sulphurea* (C. Koch), *Cryptbergia meadii* (híbrido) e *Guzmania sp.*, utilizando ápices caulinares cultivados em meio MS sólido acrescido de auxinas. Zimmer e Pieper (1976) obtiveram desenvolvimento radicular de plantas da subfamília Tillandsioideae inoculando raízes em meio MS sólido com auxinas. Ainda utilizando o meio MS sólido, Davidson e Donnan (1977) obtiveram sucesso na proliferação de gemas em *Cryptanthus bivittatus*, adicionando cinetina e AIA.

O meio MS líquido também já foi utilizado em várias situações, como na indução de brotos em extremidades de folhas de *Aechmea fasciata* e *Guzmania ssp* (Pierik, Steegmans e Hendriks, 1984) e de *Tillandsia cyanea* (Pierik e Sprenkels, 1988). Também foi utilizado na indução de brotações laterais em plântulas de *Aechmea victoriana* e *Aechmea dactylina* (Dijck, Proft e Greef, 1988), e na indução de brotos em meristemas e primórdios foliares de *Neoregelia carolinae*, adicionando-se auxina e citocinina (Tombolato *et al.*, 1991).

O meio Knudson foi desenvolvido em 1943 para propagação de sementes de orquídeas, com formulação bastante similar aos primeiros meios desenvolvidos, os quais apresentavam baixas concentrações de íons inorgânicos (George, 1996).

Mekers (1977) obteve multiplicação de brotos de espécies exclusivamente epífitas inoculando sementes em meio Knudson acrescido de auxinas, citocininas ou giberelinas. Estudando *Vriesea fosteriana* e *Vriesea hieroglyphica*, Mercier e Kerbauy (1992, 1994, 1995) obtiveram formação de gemas em folhas inoculadas em meio Knudson acrescido de ANA e BAP.

Quanto à espécie estudada neste trabalho, *Alcantarea imperialis*, não foi encontrada nenhuma pesquisa referente ao seu comportamento *in vitro*.

2.4.2 Reguladores de crescimento

Uma das peculiaridades da cultura de tecidos vegetais é a possibilidade de controle do crescimento e desenvolvimento das plantas, que realizado pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, componentes esses com a função de direcionar o metabolismo do explante *in vitro* (Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997).

Os efeitos dos reguladores de crescimento geralmente não são absolutos e específicos. A resposta das células, tecidos e órgãos *in vitro* varia de acordo com as condições de cultura, tipo de explante e genótipo da planta. Frequentemente, a combinação de dois ou mais reguladores é necessária para se obter uma determinada resposta de um explante (George, 1996).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura controla o crescimento e a morfogênese do explante, ocorrendo também interação com as substâncias de crescimento endógenas do mesmo. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos, sendo responsáveis pelo controle de formação de raízes, parte aérea e calogênese, dependendo da disponibilidade e interação desses (Skoog e Miller, 1957).

As auxinas são muito utilizadas em trabalhos de micropropagação e são incorporadas ao meio para promover o crescimento de calos e a regulação de morfogênese, principalmente em associação com uma citocinina. Estão associadas ao crescimento e alongamento celular, enraizamento, iniciando o processo de divisão celular, formação de meristemas e manutenção da dominância apical (George, 1996).

As citocininas também estimulam o processo de divisão celular, atuando conseqüentemente no processo de morfogênese (George, 1996). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o BAP (6-benzilaminopurina), é a citocinina que *in vitro* proporciona melhores resultados, dentre as comercialmente disponíveis.

O TDZ (Thidiazuron) é um regulador de crescimento que age como as citocininas, sendo mais ativo e menos degradável que essas, durante o processo de autoclavagem, já tendo sido empregado com sucesso na indução de brotações em bromeliáceas ornamentais (Naves e Pinto, 1996).

O gênero *Ananas* tem sido o mais estudado pela sua importância econômica. Cultivares de abacaxi (*Ananas comosus*) apresentaram respostas positivas de regeneração na presença dos reguladores BAP, AIB, ANA e cinetina (Matheus e Ragan, 1979; Zepeda e Sagawa, 1982; Fichet, 1990).

Cameiro (1997) cultivou explantes foliares de *Neoregelia cruenta* e *Cryptanthus sinuosus* em meio sólido suplementado com 2,2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de ANA, resultando numa produção máxima de 450 plantas por semente germinada *in vitro*, que originaram os segmentos foliares utilizados como explantes neste experimento.

Estudos realizados por Mekers (1977) demonstraram que a presença de ANA ou GA₃, na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ em meio Knudson, promoveu a germinação de *Vriesea splendens* numa taxa mais elevada que nas plantas-controle e, além disso, a auxina ANA estimulou um desenvolvimento mais prematuro nas plântulas. É interessante ressaltar que sementes de *Vriesea*

hieroglyphica cultivadas em meio basal Knudson, na ausência de reguladores de crescimento, produziram de 3 a 8 plântulas por semente, em vez da única plântula esperada na germinação normal. Mercier e Kerbauy (1995) sugeriram que esse poderia ser um caso de poliembrião induzida pelo meio de cultura.

Pierik, Steegmans e Hendriks (1984), examinando a influência da ação de auxinas na germinação de sementes e crescimento posterior de plântulas de três diferentes espécies de Bromeliaceae, constataram que o ANA, adicionado ao meio MS, foi a auxina mais eficiente para promover o crescimento de raízes e de brotos, sendo utilizada em concentrações entre 0,5 e 0,8 mg.L⁻¹.

A técnica de estiolamento foi proposta para propagação de abacaxi (*Ananas comosus*) por Kiss *et al.* (1995). Essa metodologia consiste em manter plantas já estabelecidas *in vitro* no escuro por um período de 30 dias. Após esse tempo, as plantas apresentavam-se esbranquiçadas e com os nós bem afastados um do outro. Nesta metodologia, as plantas foram então transferidas para placa de Petri contendo meio MS acrescido de reguladores de crescimento, sendo dispostas em sentido horizontal na placa. Esse processo possibilitou regeneração média de 2,6 plantas nas gemas ao longo da planta estiolada.

O nitrogênio difere dos demais macronutrientes pelo fato de se apresentar na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato). O efeito dessas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta uma boa taxa de crescimento em muitas espécies, e outras, ao contrário, não se desenvolvem (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

Quando o nitrogênio é fornecido somente na forma de sais inorgânicos de amônio, as células *in vitro* apresentam sintomas de toxidez. Uma combinação das duas formas de nitrogênio, amônio e nitrato, estimula o crescimento de muitas espécies *in vitro*, de modo que a toxidez por amônio não é absoluta. A mesma concentração de amônio, que é inibitória quando a concentração de

nitrato é baixa, permite um bom crescimento quando se eleva a concentração de nitrato (Caldas e Caldas, 1976). A razão entre as concentrações parece ser o fator determinante do crescimento, e a de amônio deve ser, no máximo, um terço do nitrogênio total fornecido no meio de cultura (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

De acordo com estudos realizados por Grossi (2000) em *Aechmea nudicaulis*, o nitrato de amônio é uma fonte adequada para o fornecimento de nitrogênio para essa e também para outras espécies de bromélias, devendo ser utilizado na faixa entre 7,5 e 30 $\mu\text{M.L}^{-1}$. Favorece-se, assim, a absorção de todos os demais nutrientes minerais, proporcionando também um bom crescimento, tanto da parte aérea como do sistema radicular. Acima desse limite, pode ocorrer toxidez, e abaixo, sintomas de deficiência na planta.

2.4.3 Desinfestação dos explantes

Zimmer e Pieper (1976) destacaram a dificuldade de se estabelecer *in vitro* explantes de bromélias destacadas de extremidades de brotos ou gemas axilares de plantas adultas oriundas do campo. Para se reduzir a porcentagem de contaminação no estabelecimento *in vitro*, Davidson e Donnan (1977) recomendaram manter as plantas-mães em uma sala com baixa umidade e sob ar condicionado por 24 semanas antes da retirada dos explantes.

O desinfetante comercial mais comumente empregado vem sendo o hipoclorito de sódio em solução diluída de 1 a 20 %, com a adição de um agente umectante como o Tween 20, em diferentes tempos de imersão (5 a 30 minutos). Em todos os casos, os explantes são lavados várias vezes em água destilada e autoclavada antes da inoculação no meio de cultura. Uma desinfecção eficiente de *Cryptanthus bromelioides* var. tricolor foi obtida com cloreto de mercúrio a 0,1% por 10 minutos (Matheus e Rao, 1982).

Plântulas provenientes de sementes de bromélias vêm sendo amplamente utilizadas como fonte de explantes em virtude de maior facilidade de desinfecção (Mercier e Kerbauy 1994).

x 2.4.4 Aclimatização

A aclimatização é apontada como uma das fases mais críticas do processo de micropropagação de plantas. Porém, de maneira geral, os trabalhos de micropropagação não relatam os procedimentos, dificuldades e soluções para o processo de aclimatização (Carneiro, 1997).

Cozai e Kitaya (1995) analisaram os componentes do ambiente *in vitro* e listaram as seguintes características relativas à parte aérea de plantas obtidas por micropropagação: redução na taxa fotossintética líquida em consequência do baixo fluxo fotônico, diminuição da transpiração, redução no fluxo de radiação térmica líquida e elevada taxa respiratória. Quanto à parte radicular, ocorre redução na absorção de água, íons e açúcar.

As condições de umidade relativa, temperatura do ar, concentração de CO₂, alta concentração de íons, açúcar e reguladores de crescimento *in vitro* tendem a ser alterados quando a planta é transferida para o local onde será submetida a condições de aclimatização, dificultando seu desenvolvimento (Cozai e Kitaya, 1995).

Outra condição importante para o sucesso da formação de mudas na fase de aclimatização *ex vitro* é o tipo de substrato utilizado, por causa dos efeitos proporcionados na translocação de água no sistema solo-planta-atmosfera e da facilidade para o estabelecimento da arquitetura do sistema radicular (Spurr e Barnes, 1973). A escolha do material a ser utilizado como substrato depende não só do objetivo a ser alcançado, mas também da disponibilidade no local, custo de aquisição e experiência do viveirista (Kampf, 1992).

Plantas epífitas, como as bromélias, exigem substratos de baixa densidade, alta permeabilidade e aeração. A presença de elevada fração de matéria orgânica no meio de cultivo pode melhorar tais características. Misturas com solo mineral podem ser usadas para o cultivo em recipientes, desde que sejam adicionados condicionadores para diminuir o peso e/ou aumentar a porosidade do meio (Kampf, 1992).

As bromélias são plantas que preferem substrato ácido (pH 4,5 a 5,5), podendo ser utilizados turfa, casca de pinus e poliuretano na composição do substrato de cultivo (Jimenez e Caballero, 1990). Carneiro (1997) utilizou com sucesso o Plantmax na aclimatização de bromélias.

Bromélias obtidas *in vitro*, segundo Mercier e Kerbauy (1994), em geral, não demonstram dificuldade para aclimatização em vasos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, UFLA, em Lavras/MG.

3.2 Material vegetal

Para os experimentos foi utilizada a espécie bromélia imperial, *Alcantarea imperialis* (= *Vriesea imperialis* V.L. Harms) var. “rubra” (Figura 1), selecionada pela ampla utilização em projetos paisagísticos, estando ameaçada

de extinção em consequência do ao extrativismo seletivo em seus ambientes de origem. O material propagativo foi retirado de plantas ocorrentes em jardins do campus da UFLA.



FIGURA 1. Exemplar de *Alcantarea imperialis* var. “rubra”, cultivado em casa-de-vegetação, com botão floral. Foto de Peter Franklin. Bromeliad Society International, (2001).

3.3 Experimentos

3.3.1 Germinação *in vitro* e *in vivo* de sementes de *Alcantarea imperialis*

Os frutos de *Alcantarea imperialis* foram coletados antes que as cápsulas se abrissem naturalmente para dispersão das sementes. Essas cápsulas foram levadas para o laboratório, onde foram abertas, retiradas as sementes e colocadas em bolsas de tecido permeável. Essas bolsas foram submetidas à assepsia constituída de: 1) lavagem com detergente em água destilada, 2) imersão em álcool 70% por 5 minutos, 3) imersão em solução de hipoclorito de sódio 70%, 1,0 g.L⁻¹ de Benlate e 2 gotas/100 ml do espalhante adesivo Tween 20, durante 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram lavadas em água destilada e autoclavada por 4 vezes e, então, dispostas em frascos contendo 40 ml de meio de cultura MS (Tabela 1A) nas seguintes concentrações: 0, 25, 50, 75, 100 e 125% em relação à composição original. O meio de cultura foi acrescido de 7 g.L⁻¹ de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem, realizado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos. Em cada frasco foram colocadas 10 sementes e o experimento foi repetido 4 vezes, totalizando 40 sementes por tratamento. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado.

O material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1°C e fotoperíodo de 16 h luz por 8 semanas. Os parâmetros analisados foram tempo gasto para iniciar a germinação, porcentagem de germinação e tamanho de plântulas ao final de 8 semanas.

Sementes de bromélias também foram colocadas para germinar *in vivo* com o objetivo de se comparar com a produção *in vitro*. Para isso, as sementes foram retiradas dos frutos, espalhadas uniformemente sobre placa de xaxim na quantidade de 40 sementes por placa, as quais foram mantidas dentro de

bandejas plásticas com água a fim de manter a umidade da placa até a germinação. A bandeja foi mantida sob sombrite e foram avaliados os parâmetros: tempo gasto para iniciar a germinação, porcentagem de germinação e tamanho de plântulas após 8 semanas.

3.3.2 Avaliação de diferentes meios de cultura para o desenvolvimento *in vitro* de *Alcantarea imperialis*

O experimento foi constituído pelos seguintes tratamentos: três concentrações do meio MS (50%, 100% e 150%) e três concentrações do meio Knudson modificado (Tabela 2A) (50%, 100% e 150%). Em todos os tratamentos foram adicionados thidiazuron (TDZ) na concentração 0,02 mg.L⁻¹, 7g.L⁻¹ de ágar e o pH foi ajustado para 5,8, antes do processo de autoclavagem, realizado a 121°C, 1 atm por 20 minutos. Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio, contendo 20 ml de meio em cada.

Procedeu-se à inoculação das plântulas de *Alcantarea imperialis*, semeadas *in vitro* e já com 8 semanas, as quais tiveram suas folhas e raízes cortadas, permanecendo apenas o pequeno caule contendo as gemas axilares.

Após a inoculação dos explantes em câmara de fluxo laminar, o experimento foi transferido para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 3000 lux, temperatura de 26 ± 1°C, permanecendo nessas condições durante 120 dias.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada parcela constituída por 4 tubos de ensaio contendo uma planta por tubo. Os explantes foram avaliados aos 120 dias, observando-se a quantidade de explantes responsivos, número e tamanho dos brotos formados, tamanho do explante inicial, ocorrência de raízes, ocorrência de entumescimento e calogênese.

3.3.3 Efeito de BAP e ANA sobre o desenvolvimento *in vitro* de brotos de *Alcantarea imperialis*

O meio de cultura pré-determinado pelo melhor resultado observado no experimento anterior, MS na sua concentração original, foi acrescido de BAP nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0, 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ em combinação com ANA a 0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹, perfazendo um fatorial 5x4. O meio foi acrescido de 7 g.L⁻¹ de ágar, tendo o pH ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem, realizado a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Os explantes utilizados foram plântulas germinadas *in vitro* com 8 semanas de idade. Esses brotos tiveram suas folhas e raízes cortadas, permanecendo apenas o caule com as gemas axilares.

O experimento foi conduzido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 3000 lux e temperatura de 26 ± 1°C.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. Cada parcela foi constituída por 4 tubos de ensaio contendo uma plântula por tubo. Os explantes foram avaliados aos 120 dias, observando-se a quantidade de explantes responsivos, número e tamanho dos brotos formados, ocorrência de raízes, entumescimento, calogênese e tamanho do explante inicial.

3.3.4 Efeito de TDZ e ANA sobre o desenvolvimento *in vitro* de brotos de *Alcantarea imperialis*

Ao meio de cultura MS na sua concentração original, acrescentou-se TDZ nas concentrações 0,0; 0,01; 0,02, 0,05 e 0,1 mg.L⁻¹, em combinação com ANA a 0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹, perfazendo um fatorial 5x4. O meio foi

acrescido de 7 g.L^{-1} de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem, realizado a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Foi então realizada a inoculação dos explantes de *Alcantarea imperialis*, provenientes de sementes germinadas *in vitro*. Esses se apresentavam com 8 semanas de idade e tiveram suas folhas e raízes retiradas, inoculando-se apenas o caule contendo as gemas axilares.

O experimento foi conduzido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 3000 lux e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. Cada parcela foi constituída por 4 tubos de ensaio contendo uma planta por tubo.

Os explantes foram avaliados aos 120 dias, observando-se a quantidade de explantes responsivos, número e tamanho dos brotos formados, ocorrência de raízes, entumescimento, calogênese e tamanho do explante inicial.

3.3.5 Avaliação do efeito de ANA sobre a indução de enraizamento em brotos de *Alcantarea imperialis* cultivados *in vitro*

Ao meio de cultura MS na sua concentração original, foi acrescentado ANA nas concentrações 0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Ao meio, foram acrescentados ainda 7 g.L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem, realizado a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Os explantes utilizados foram as brotações obtidas nos experimentos de multiplicação, após 120 dias de cultivo, mantendo-se a parte aérea intacta durante a inoculação. As plântulas inoculadas foram padronizadas, apresentando altura entre 1 e 2 cm. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 3000 lux e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. Cada parcela foi constituída por 4 tubos de ensaio contendo uma planta cada um. A avaliação foi realizada aos 60 dias, observando-se a ocorrência de raízes, tamanho de raiz, altura da parte aérea e número de brotos.

3.3.6 Aclimatização

Para aclimatização, foram utilizados brotos com e sem raízes, para se avaliar a adaptação desses *ex-vitro*. Os brotos foram plantados em bandejas de isopor de 120 células contendo Plantmax como substrato e mantidos sob sombrite 80% em casa-de-vegetação com irrigação intermitente e temperatura média de 25°C. Foram utilizadas 30 plantas com raiz e 30 sem raiz, sendo o experimento repetido por 2 vezes. As plantas foram avaliadas após 30 dias, observando-se a porcentagem de sobrevivência das mudas.

3.3.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos experimentos foram feitas utilizando o sistema SISVAR[®] versão 4.3 (Ferreira, 1999). Os dados foram analisados por meio do teste de regressão, e para diferenças entre os tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey.

Para as características ocorrência de calos, entumescimento e formação de raízes, foram atribuídas notas durante as avaliações. Quando essas características eram observadas, atribuiu-se nota 1, e na sua ausência, nota 0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação *in vitro* e *in vivo* de sementes

Na germinação de sementes, em que foram analisados os parâmetros tempo de germinação, número de sementes germinadas e tamanho das plântulas após 8 semanas de semeadura, pôde-se observar que houve variação não só para o tipo de semeadura, *in vivo* e *in vitro*, como também em relação às diferentes concentrações do meio MS utilizadas neste experimento. Os resultados da análise de variância estão descritos na Tabela 1.

A germinação *in vivo* foi testada para comparação, não sendo somada para efeito de análise estatística, uma vez que o erro em casa-de-vegetação seria diferente das condições da sala de crescimento onde o experimento de germinação *in vitro* foi conduzido.

TABELA 1. Resumo das análises de variância do experimento de germinação *in vitro* de *A. imperialis*, em diferentes concentrações do MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Causas da variação	GL	Tempo para germinar	Porcentagem de sementes germinadas	Altura média de plântula
Concentrações do meio MS	5	179,833333**	8600,000000**	43,223750**
Resíduo	18	10,500000	600,000000	1,762500
CV(%)		4,11	6,79	7,26

** Significativo a 1% de probabilidade

O tempo necessário para germinação variou entre 15 dias, para o melhor resultado de germinação *in vitro*, e 26 dias, para germinação *in vivo* (Figura 2A), dependendo do tipo de germinação e da concentração do meio MS. Resultados semelhantes foram observados por Mercier e Kerbauy (1995) e Carneiro (1997) na germinação de outras espécies de bromélias. O período necessário para a germinação *in vitro* mostrou-se significativamente superior ao *in vivo*, mesmo quando a concentração do MS foi 0%, chegando esse tempo a ser reduzido em 10 dias em concentrações superiores a 75% do MS. Entre as concentrações do meio MS testadas, os melhores resultados foram encontrados nas concentrações superiores a 75% do meio, as quais não diferiram estatisticamente entre si.

O tempo gasto para germinação *in vivo* coincidiu com as observações realizadas por Dosolto (2001), que afirma que a germinação de *Alcantarea imperialis* em bandeja contendo turfa e areia fica em torno de 20 a 30 dias. Em placa de xaxim, método utilizado neste experimento, a germinação ocorreu, em média, em 26 dias.

Quando se avaliou a porcentagem de germinação, como pode ser observado na figura 2B, notou-se maior porcentagem de germinação quando se utilizou MS em concentrações superiores a 50%, não havendo diferença estatística entre esses tratamento em praticamente 100% de germinação das sementes inoculadas *in vitro*. A porcentagem de germinação em placa de xaxim foi bastante inferior, atingindo aproximadamente 40%. Por causa do tamanho reduzido das sementes de *A. imperialis*, pode-se afirmar que esse melhor desempenho na porcentagem de germinação, se deve à maior concentração de nutrientes no meio de germinação, já que a quantidade de reservas dessa semente é muito pequena, e a germinação só é percebida quando a plântula já está mais desenvolvida.

A altura final das plântulas, após 8 semanas de germinação, variou de 1,72 a 5,62 cm. A média de altura das plântulas germinadas em placa de xaxim

superou apenas a média das cultivadas na concentração 0% do MS. A altura das plântulas germinadas em meio MS aumentou proporcionalmente à elevação da concentrações do meio, tendendo a se estabilizar nos valores acima de 75% da concentração do MS (Figura 2C).

Ao contrário do que foi relatado por Mercier e Kerbaux (1995), que utilizaram meio Knudson sólido para germinação de sementes de *Vriesea hieroglyphica*, não foi observada poliembrionia induzida pelo meio de cultura neste trabalho, originando uma única plântula de cada semente. Carneiro (1997) também não observou poliembrionia quando germinou outras sementes de bromélia em meio MS, podendo ser uma característica da espécie ou do meio Knudson.

* Pode-se, então, afirmar que o meio MS, na concentração de 75%, foi bastante eficiente para germinação de sementes de *Alcantarea imperialis*, superando a germinação *in vivo*, não só no tempo gasto para germinar, como também na porcentagem de germinação e na qualidade final das plântulas germinadas *in vitro*.

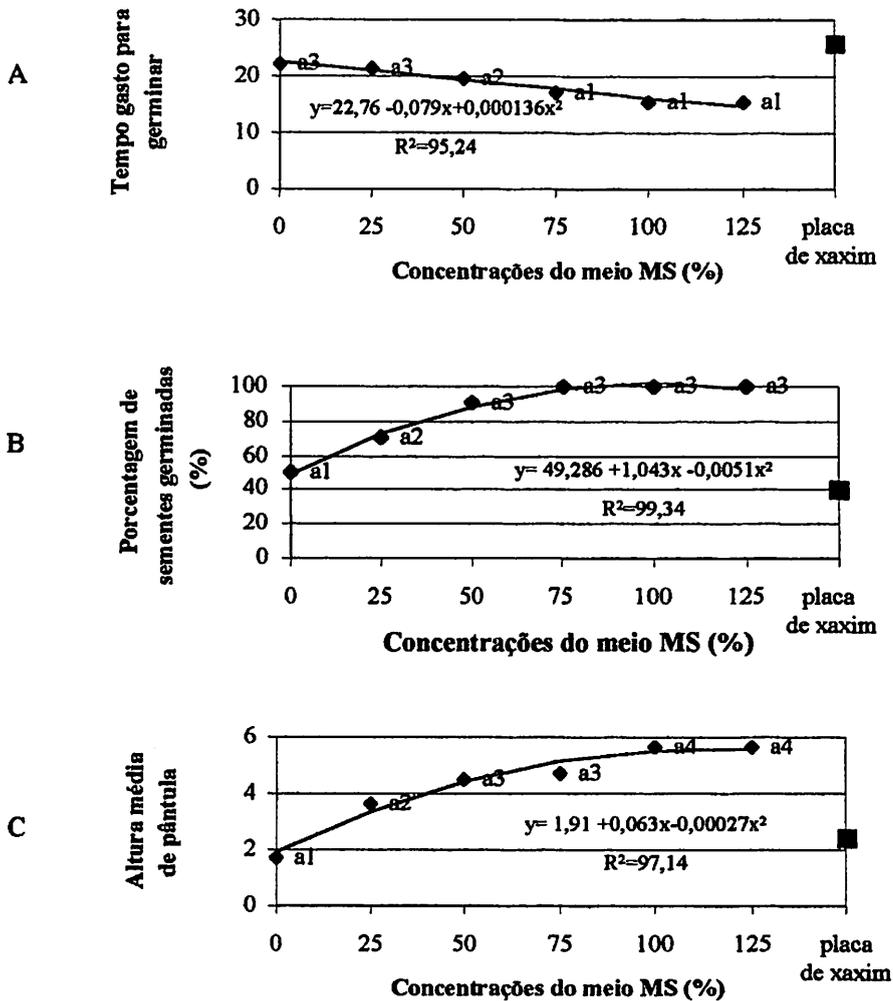


FIGURA 2. Número médio de dias necessários para germinação (A), porcentagem de sementes germinadas (B) e tamanho médio de plântulas (C) de *Alcantarea imperialis* germinadas *in vivo* e *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.2 Avaliação de diferentes meios de cultura para o desenvolvimento *in vitro* de *Alcantarea imperialis*

Objetivou-se nesta fase determinar o tipo de meio de cultura e a concentração ideal para o desenvolvimento *in vitro* da bromélia imperial, partindo do princípio de que não só o crescimento, como também a morfogênese *in vitro*, podem ser influenciados pelos componentes do meio e pela forma como se apresentam.

Para interagir com os diferentes meios de cultura, foi adicionada em todos os tratamentos uma concentração fixa de TDZ, $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$, a fim de estimular o processo de morfogênese. Essa concentração de TDZ foi utilizada com sucesso por Naves e Pinto (1996) na indução de brotações em bromeliáceas.

Como o meio de cultura não possuía nenhuma auxina associada ao TDZ, não houve formação de raízes, nem desenvolvimento de calos nos explantes.

Pela Tabela 2 verificam-se os resultados das análises estatísticas realizadas para os parâmetros analisados neste experimento.

TABELA 2. Resumo das análises de variância do experimento de avaliação de diferentes meios de cultura em função da porcentagem de explantes responsivos, número de brotos, altura média dos brotos, entumescimento e altura média do explante inicial de *Alcantarea imperialis*. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Causas da variação	GL	Porcentagem de explantes responsivos	Número de brotações	Altura média de brotos	Entumescimento	Altura média explante inicial
Tipo de meio	1	3151,041667**	0,956004**	5,548817**	7526,041667**	47,012004**
Concentrações	2	1458,333333**	0,462808**	3,058058**	2239,583333*	18,755208**
Tipo de meio* Concentrações	2	208,333333*	0,055308*	1,230558**	989,583333*	7,6940008**
Resíduo	18	4531,250000	0,431875	2,115750	7968,750000	2,016475
CV(%)		66,22	47,72	49,75	54,59	11,20

**Significativo a 1% de probabilidade

*Significativo a 5% de probabilidade

4.2.1 Explantes responsivos

Considerou-se explante responsivo o explante que emitiu pelo menos uma brotação, na ocasião de avaliação do experimento.

Observa-se que houve influência dos diferentes meios de cultura (MS e Knudson) e das concentrações testadas sobre a porcentagem de explantes que responsivos. Os explantes apresentaram poucas respostas em concentrações mais baixas do meio de cultura (0 e 50%), demonstrando que a presença de nutrientes é fundamental para estimular o desenvolvimento (Figura 3A).

Para o meio Knudson, obtiveram 0; 12,5 e 25% de explantes responsivos nas concentrações testadas: 50, 100 e 150 %, respectivamente. Para o meio MS, o número de explantes responsivos foi de 37; 25 e 43,75%, respectivamente para as concentrações 50, 100 e 150% da concentração original. O meio MS, que apresenta em sua constituição maiores concentrações de nutrientes, apresentou respostas sensivelmente mais altas em relação aos explantes cultivados em meio Knudson, mais pobre nesse macronutriente. Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações do meio Knudson e do meio MS (Figuras 3B e C).

Carneiro (1997) obteve 30% de resposta do explante quando utilizou caules de *C. sinuosus* inoculados em meio MS contendo TDZ, sem adição de auxinas.

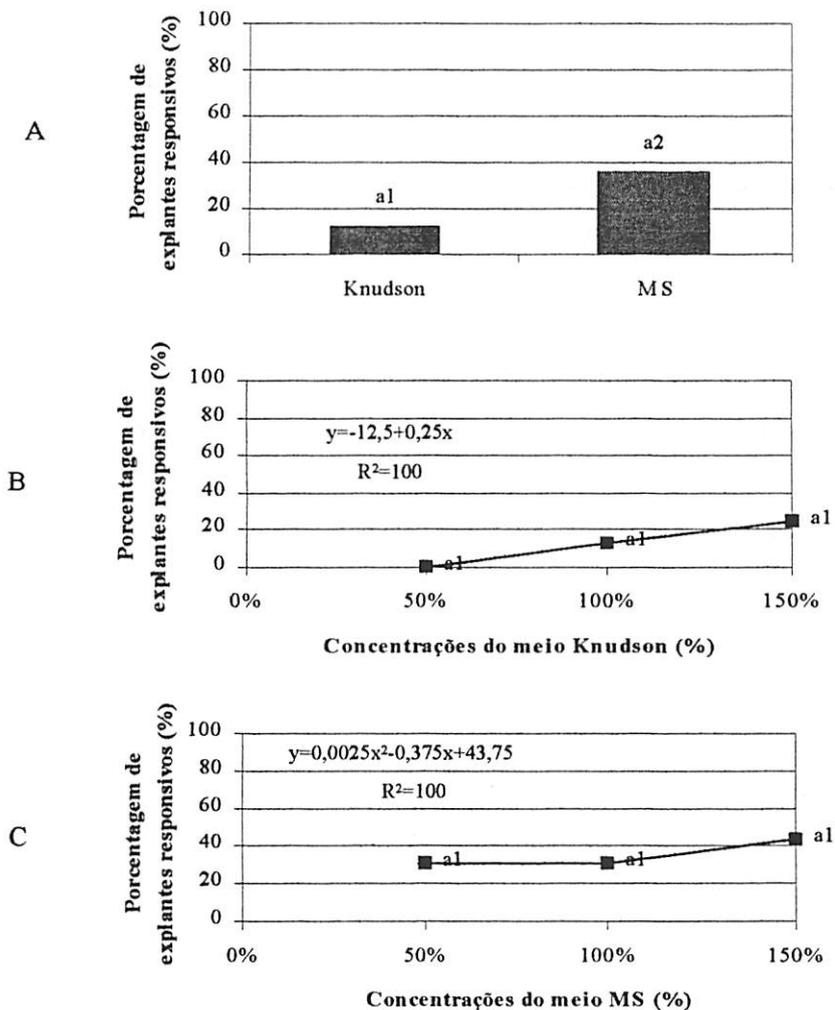


FIGURA 3. Porcentagem de explantes responsivos de *Alcantarea imperialis* : (A) Comparação entre os meios de cultura; (B) comportamento em diferentes concentrações do meio Knudson e (C) comportamento em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.2.2 Número de brotações

A formação de brotações também foi afetada pelo tipo de meio utilizado. O número médio de brotos formados no meio MS foi mais elevado em relação ao meio Knudson, com 0,52 e 0,125 brotos por explante, respectivamente (Figura 4A). Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações testadas do meio Knudson (Figura 4B). Para o meio MS, as concentrações de 100 e 150% promoveram formação de maior número de brotos, sem, no entanto, apresentar diferença significativa entre si, em valores superiores aos resultados dos explantes cultivados em 50%, conforme demonstrado na Figura 4C.

A quantidade de nutrientes do meio de cultura parece influenciar o número de brotações emitidas por *Alcantarea imperialis*, pois, em meio Knudson, mais pobre em nutrientes, conforme já descrito por George (1996), o número médio de brotações emitidas foi bastante inferior, em comparação ao meio MS. Essa mesma observação foi feita quando se reduziu a concentração do meio MS à metade.

Quando se altera a concentração de um meio de cultura, a disponibilidade de sais do meio também é alterada, o que pode influenciar na morfogênese das culturas *in vitro*.

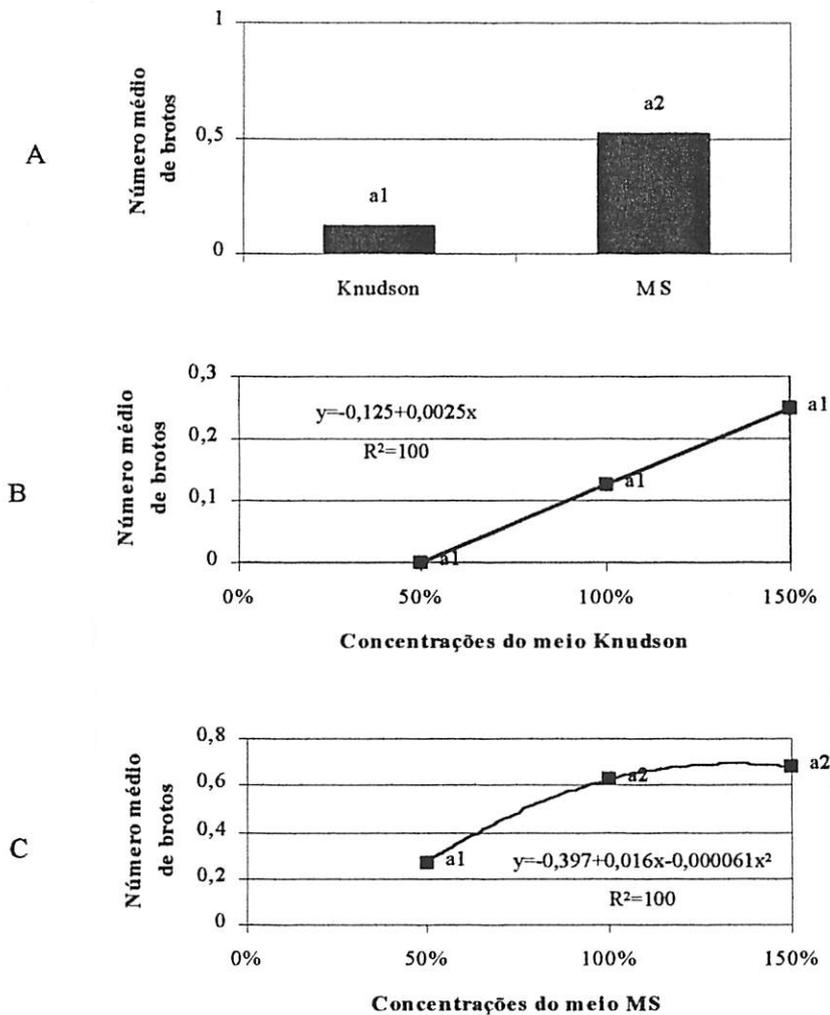


FIGURA 4. Número médio de brotos formados em explantes de *Alcantarea imperialis* cultivados *in vitro*: (A) Comparação entre os meios de cultura; (B) comportamento em diferentes concentrações do meio Knudson e (C) comportamento em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.2.3 Altura média de brotos

A altura média de brotos formados *in vitro* apresentou o mesmo comportamento que o número de brotações, ocorrendo média de 0,2 cm para os cultivados no meio Knudson e 1,2 cm para os do meio MS (Figura 5A). Dentre as diferentes concentrações de cada meio, não houve diferença entre as alturas dos brotos formados no meio Knudson, ao passo que no meio MS as concentrações 100 e 150% proporcionaram maior altura de brotos, 1,7 e 1,4 cm respectivamente, sendo superiores aos cultivados na concentração 50%. Esses resultados estão demonstrados na Figuras 5B e C.

O tamanho final dos brotos parece não concorrer com a quantidade de brotos emitidos, pois ambos os parâmetros tendem a aumentar à medida que aumenta a concentração de nutrientes no meio de cultura.

O baixo desempenho dessa espécie, quando cultivada em meio Knudson (Cândido, 1996), pode ser atribuído não só à menor disponibilidade de nutrientes desse meio, mas também à forma de fornecimento de nitrogênio (Caldas, 1998), que é diferente em relação ao MS.

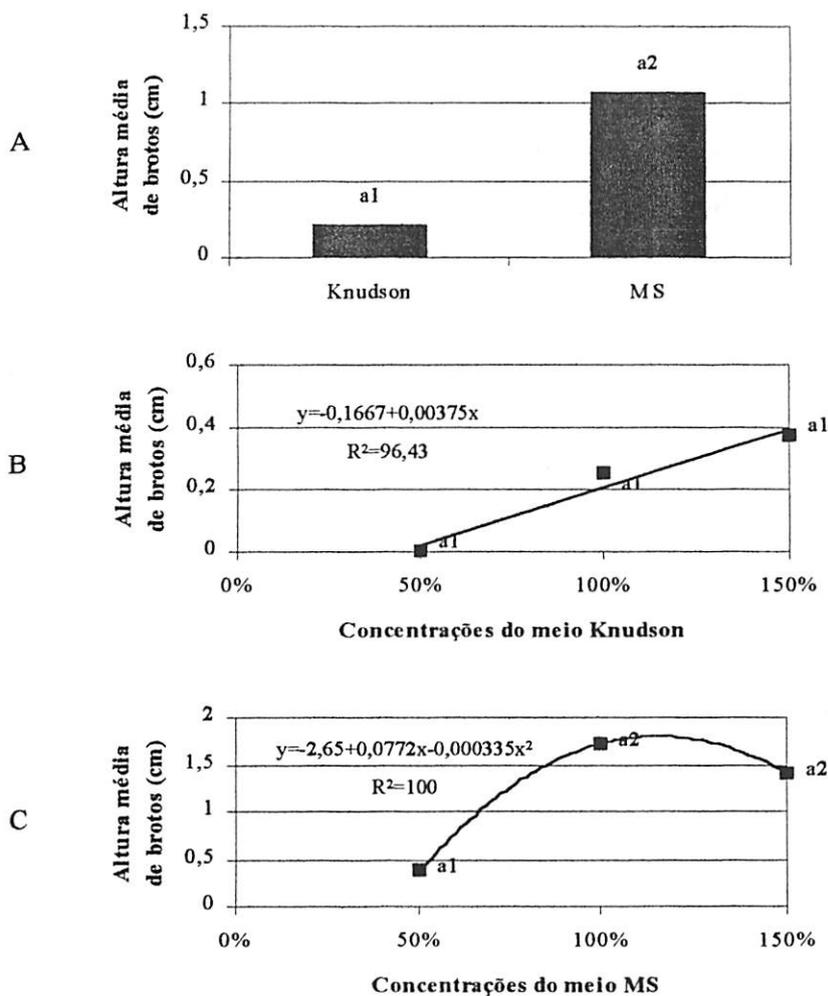


FIGURA 5. Altura média de brotos de *Alcantarea imperialis* formados em explantes cultivados em diferentes meios de cultura: (A) Comparação entre os meios de cultura; (B) comportamento em diferentes concentrações do meio Knudson e (C) comportamento em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.2.4 Entumescimento

O entumescimento é um tipo de formação que parece preceder a emissão de brotações. Nos explantes cultivados em meio Knudson, cerca de 25% apresentaram entumescimento, ao passo que no meio MS ocorreu em torno de 50% (Figura 6A). Dentro das diferentes concentrações, em ambos os meios, não houve diferença significativa entre os tratamentos, conforme representado nas Figuras 6B e C.

A presença de entumescimento em explantes de bromélias parece ser uma reação comum das plantas dessa família, já tendo sido relatada anteriormente por Naves e Pinto (1996) e por Carneiro (1997), os quais registraram a presença de protuberâncias nos seus explantes. Trata-se de um crescimento anormal na base do explante, diferindo da formação de calos por apresentar um aspecto liso, como de um bulbo.

Na maioria dos casos, o aparecimento dessas protuberâncias não interfere no número de brotações, a não ser em concentrações muito elevadas de reguladores de crescimento, quando em vez de brotos, elas precedem a formação de calos.

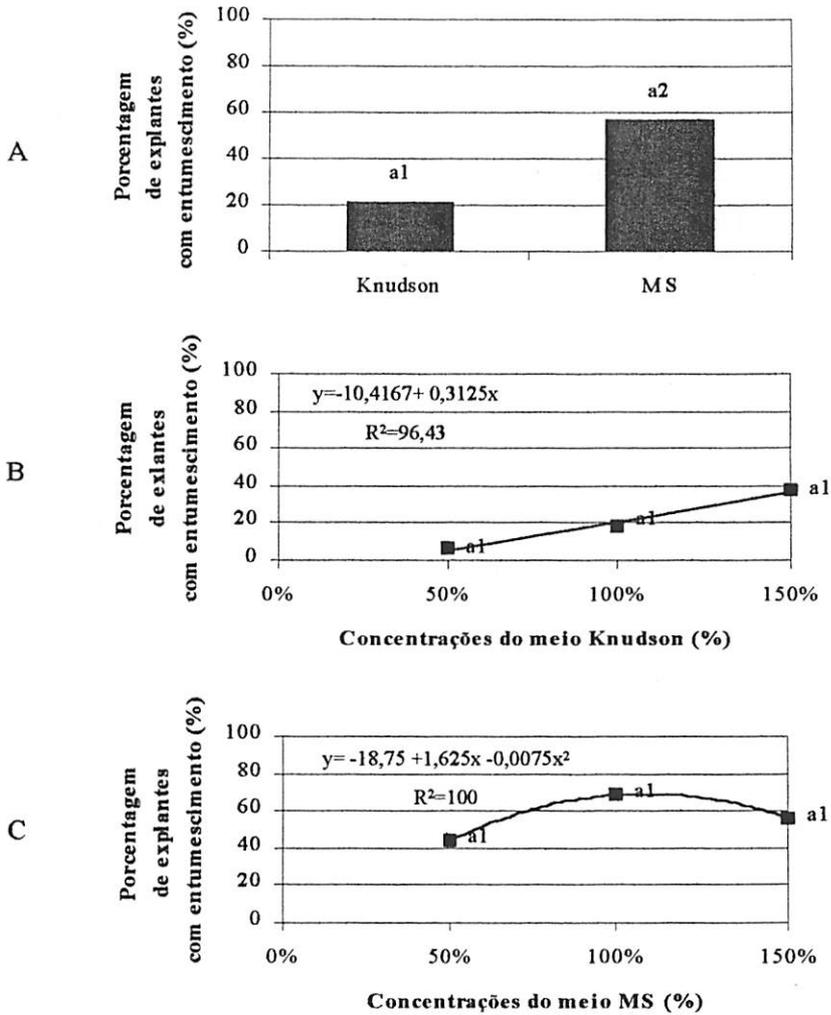


FIGURA 6. Porcentagem de explantes de *Alcantarea imperialis* com presença de entumescimento: (A) Comparação entre os meios de cultura; (B) comportamento em diferentes concentrações do meio Knudson e (C) comportamento em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.2.5 Altura média do explante inicial

Observou-se também o desenvolvimento do explante inicial. Avaliou-se a altura do explante ao final do experimento, em virtude dos diferentes tratamentos aplicados.

Houve uma tendência de maior crescimento do explante inicial quando cultivados no meio MS, chegando à média de 4,4 cm de comprimento, ao passo que no meio Knudson, a média foi de 1,6 cm (Figura 7A). Ao contrário dos outros parâmetros, a diferença no tamanho do explante inicial foi significativa entre as diferentes concentrações testadas dos meios de cultura, crescendo proporcionalmente à medida que se aumentaram as concentrações dos meios, como ilustram os gráficos da Figura 7 (B e C).

Observa-se que o meio MS em maiores concentrações proporcionou maior desenvolvimento do explante e maior número de brotos de maior tamanho, não demonstrando ter ocorrido concorrência entre a formação de brotos e a altura desses.

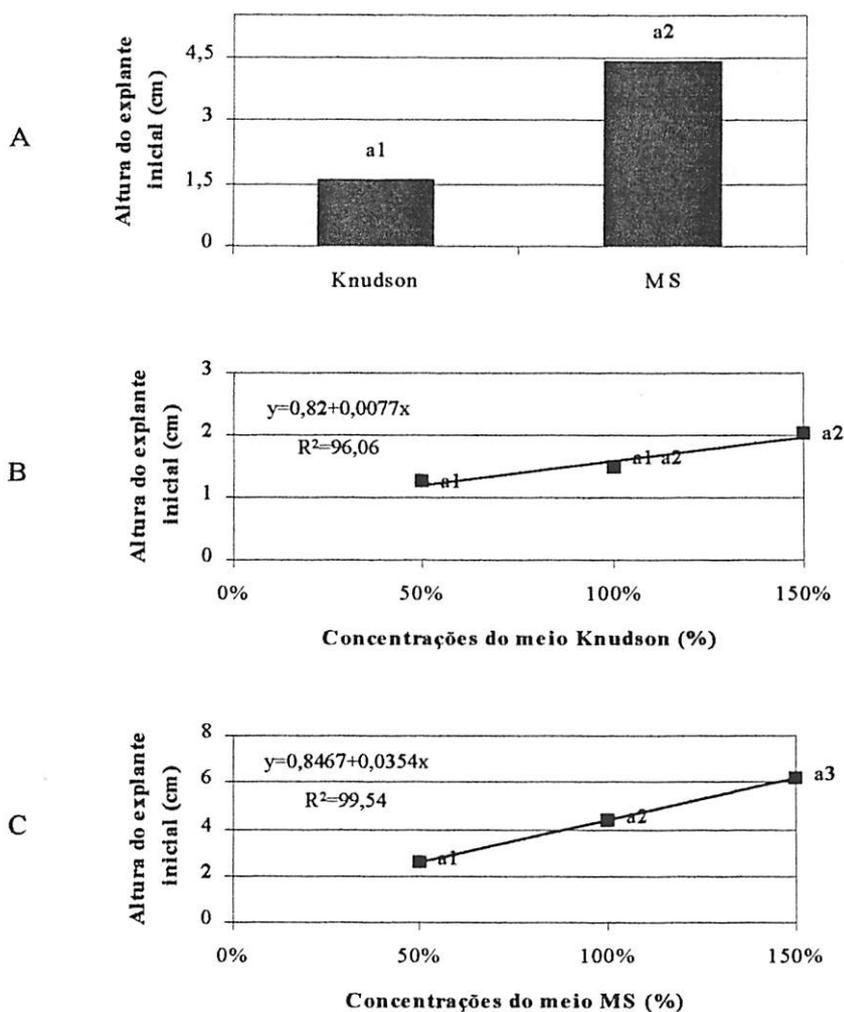


FIGURA 7. Altura média do explante inicial de *Alcantarea imperialis* em cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura: (A) Comparação entre os meios de cultura; (B) comportamento em diferentes concentrações do meio Knudson e (C) comportamento em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.3 Efeitos dos reguladores de crescimento BAP e TDZ associados ao ANA sobre o desenvolvimento *in vitro* de brotos de *Alcantarea imperialis*

Compararam-se os efeitos das citocininas BAP e TDZ associados à auxina ANA, em experimentos isolados, sobre o desenvolvimento *in vitro* de brotações da *Alcantarea imperialis*. Os resumos das análises de variâncias para esses experimentos estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3. Resumo das análises de variância do experimento de efeito de diferentes concentrações de TDZ e ANA na indução de brotos em função da porcentagem de explantes responsivos, número de brotos, altura dos brotos, entumescimento, ocorrência de calos, altura média do explante inicial e enraizamento de *Alcantarea imperialis*. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Causas da variação	GL	Porcentagem de explantes responsivos	Número de brotos	Altura dos brotos formados	Entumescimento	Ocorrência de calos	Altura média do explante inicial	Enraizamento
ANA	3	17371,5828**	22,1302**	24,4062**	1841,1596**	51138,8889**	105,8431**	21299,6032**
TDZ	4	36071,1408**	39,2102**	43,3091**	106190,7963**	44199,0911**	703,8193**	86228,0433**
ANA*TDZ	12	10305,3472**	22,1826**	27,0895**	14333,0132**	19175,9089**	379,4717**	19298,7424**
Resíduo	60	9994,1651	3,1955	20,7392	13853,7809	22986,1111	96,2393	8103,298611
CV(%)		34,13	21,49	43,45	22,30	52,19	19,56	30,23

**Significativo a 1% de probabilidade

*Significativo a 5% de probabilidade

TABELA 4. Resumo das análises de variância do experimento de efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na indução de brotos em função da porcentagem de explantes responsivos, número de brotos, altura dos brotos, entumescimento, ocorrência de calos, altura média do explante inicial e enraizamento de *Alcantarea imperialis*. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Causas da variação	GL	Porcentagem de explantes responsivos	Número de brotos	Altura dos brotos formados	Entumescimento	Ocorrência de calos	Altura média do explante inicial	Enraizamento
ANA	3	4406,2500**	1,5629**	2,8688**	12062,5000**	15023,4375**	1,2204*	1898,4375**
BAP	4	17265,6250**	4,8104**	16,2227**	105906,2500**	32000,0000**	593,7960**	94531,2500**
ANA*BAP	12	27546,8750**	11,2942**	12,6406**	5281,2500**	24312,5000**	113,7736**	7593,7500**
Resíduo	60	10000,0000	3,0473	12,5814	12500,0000	18281,2500	18,1040	468,7500
CV(%)		45,90	49,98	52,45	19,91	43,98	14,22	16,26

**Significativo a 1% de probabilidade

*Significativo a 5% de probabilidade

4.3.1 Explantes responsivos

Não foi observada qualquer resposta dos explantes quando foram cultivados em meios desprovidos de reguladores de crescimento. O incremento nas concentrações de ANA, isoladamente, aumentou também as respostas dos explantes em relação à emissão de brotos. Em média, houve brotação de 62,5% a 68,75% dos explantes nos meios com adição de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA (Figura 8). Em concentrações superiores, houve redução na indução de brotações. Apesar de a ação das auxinas, segundo George (1996), estar mais associada ao enraizamento e alongamento celular, houve aparecimento de brotações em *Alcantarea imperialis*. Não se pode afirmar que essas brotações foram induzidas pela auxina, mas a adição dessa no meio pode ter afetado o balanço interno de fitormônios da planta, provocando o surgimento de brotações.

Ao se adicionar TDZ na concentração $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ao meio de cultura, houve aumento do número de explantes responsivos, atingindo o seu máximo quando associado a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, confirmando a afirmação de Skoog e Miller (1957) de que a associação desses dois tipos de reguladores, auxina e citocinina, potencializa a resposta de explantes em cultura de tecidos. Utilizando o TDZ, na ausência de ANA, Carneiro (1997) conseguiu 30% de resposta em folhas e 80% em caules de *Cryptanthus sinuosus*, o que demonstra que essa espécie responde mais prontamente à indução por reguladores que a *Alcantarea imperialis*.

A associação de TDZ e ANA continuou elevando a resposta do explante até a concentração $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ, quando atingiu o seu máximo, ocorrendo 87,5% de explantes responsivos. A melhor associação para TDZ foi $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Concentrações mais elevadas desses dois reguladores diminuíram a brotação dos explantes (Figura 8A). As equações das curvas da Figura 8 estão apresentadas na Tabela 3A do Anexo.

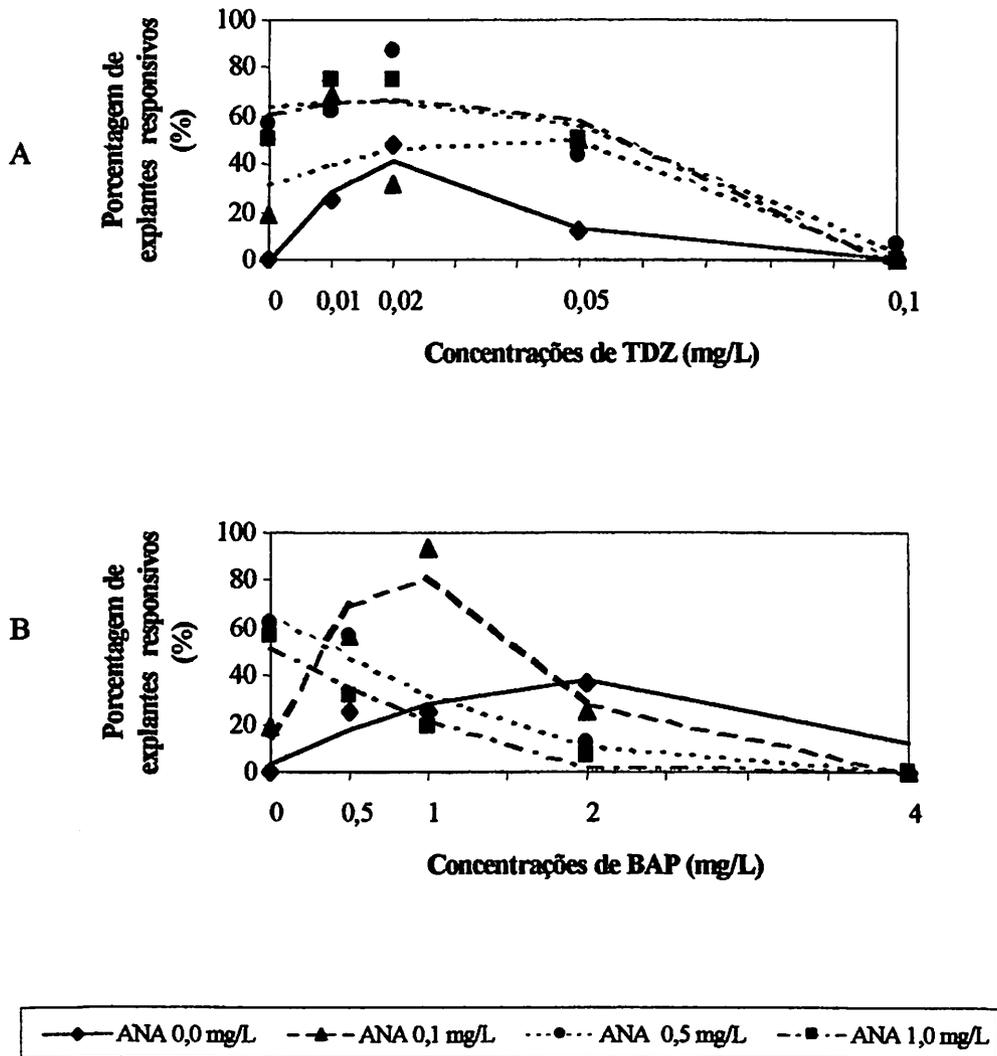


FIGURA 8. Porcentagem de explantes responsivos de *Alcantarea imperialis* cultivada em meios com TDZ (A) e BAP (B) associados ou não à auxina ANA. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Carneiro (1997) obteve 40% de explantes responsivos independente da concentração de BAP aplicado, cultivando *Cryptanthus sinuosos* em meio MS. No caso da *Alcantarea imperialis*, a adição de BAP ao meio, na ausência de ANA, aumentou a resposta dos explantes até a concentração de 2,0 mg.L⁻¹, tendendo a cair em concentrações mais elevadas (Figura 8B). O uso de BAP associado ao ANA na concentração 0,1 mg.L⁻¹ proporcionou aumento de resposta do explante, atingindo seu máximo (93,75%) na concentração de 1,0 mg.L⁻¹. Comparando-se esses resultados, observa-se que a utilização da citocinina BAP apesar de proporcionar brotação de maior número de explantes em relação ao TDZ, a média em número de brotos por explante é superior na presença do TDZ.

4.3.2 Número de brotações

Apesar de a citocinina BAP ter induzido respostas nos explantes em valores ligeiramente superiores à ação do TDZ, seu desempenho foi bem inferior em relação ao número médio de brotações emitidas. O uso de 1,0 mg L⁻¹ de BAP associado a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA proporcionou um número máximo de 1,58 broto por explante. À medida que se aumentaram as concentrações de BAP houve redução na formação de brotos (Figura 9B). Concentrações em valores próximos a essa foram recomendadas por Mercier e Kerbauy (1995), que cultivaram folhas de *Vriesea hieroglyphica* e *Vriesea forsteriana* em meio Knudson utilizando 2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA para indução de brotações.

A associação do TDZ com o ANA aumentou a indução de brotações até a concentração 0,02 mg.L⁻¹, atingindo seu máximo na presença de ANA a 0,1 mg.L⁻¹, produzindo média de 3,18 brotações por explante. A associação de

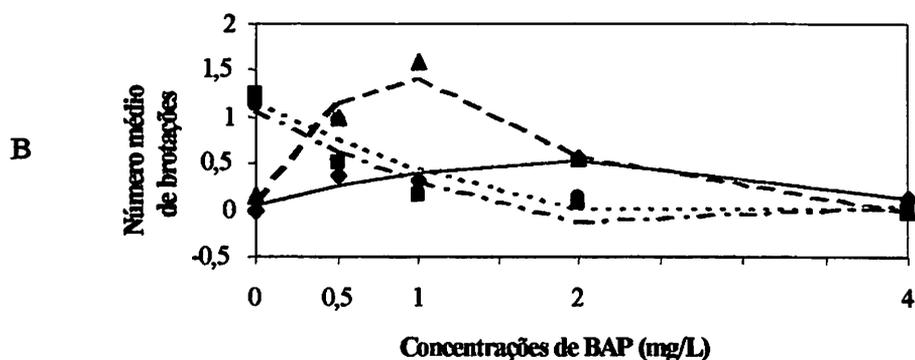
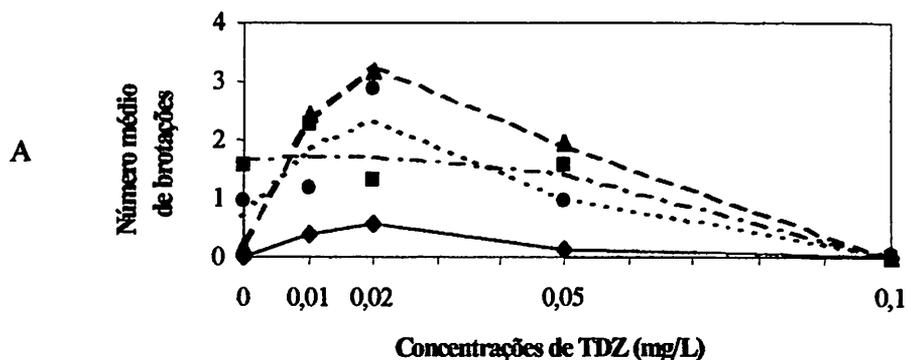
concentrações mais elevadas desses dois reguladores diminuiu o número de brotações formadas (Figura 9A).

Pôde-se observar que o número de explantes responsivos não influenciou o número médio de brotações em um tratamento. Apesar de o melhor resultado para explante responsivo ter sido obtido nas concentrações 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, 98% de explantes com pelo menos uma brotação, figura 8B, o número médio de brotos nessa concentração foi de 1,5 brotos/ explante.

No caso do TDZ, a maior porcentagem de explantes responsivos, 83%, foi obtida nas concentrações 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA. Porém a maior média de número de brotos, 3,18 brotos/explante, foi obtida nas concentrações 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA.

Podemos concluir que apesar de promoverem brotações em um maior número de explantes nas concentrações 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA, os explantes produziram uma maior quantidade de brotos individualmente quando tratados com 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA.

Hosoki e Asahira (1980) obtiveram formação de 10,5 brotos por folha de *Quesnelia quesneliana*, quando cultivada em meio MS líquido acrescido de ANA, demonstrando que o ANA utilizado isoladamente no meio de cultura pode induzir brotações. Carneiro (1997) obteve uma taxa máxima de 11,66 brotos por folha de *Quesnelia arvensis* cultivadas em meios MS sólido e líquido na presença de BAP e ANA. Em outro caso, trabalhando com *Cryptanthus sinuosos*, o próprio Carneiro (1997) obteve produção máxima de 41,29 brotos, também na presença de BAP e ANA. As equações para as curvas da Figura 9 estão apresentadas na Tabela 3A do Anexo.



—◆— ANA 0,0 mg/L -▲- ANA 0,1 mg/L ...●... ANA 0,5 mg/L --■-- ANA 1,0 mg/L

FIGURA 9. Número médio de brotos formados em explantes de *Alcantarea imperialis* cultivados em meio de cultura adicionado de diferentes concentrações de TDZ (A) e BAP (B), associados ao ANA. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Neste trabalho, a aplicação do ANA, na ausência de citocininas, chegou a produzir média de 1,56 broto em *Alcantarea imperialis*, quando aplicado na concentração de 0,5 mg.L⁻¹.

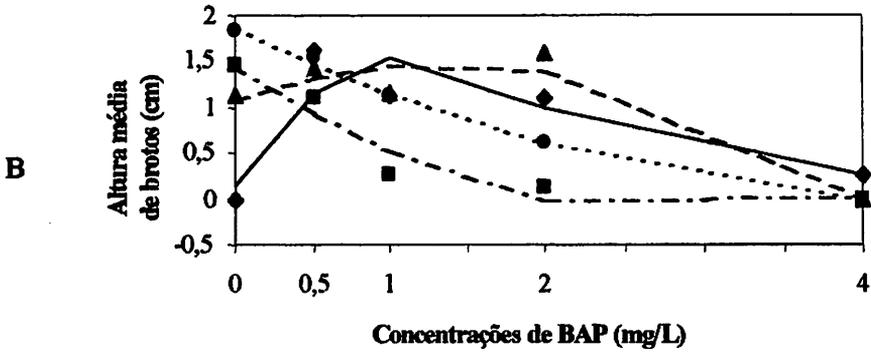
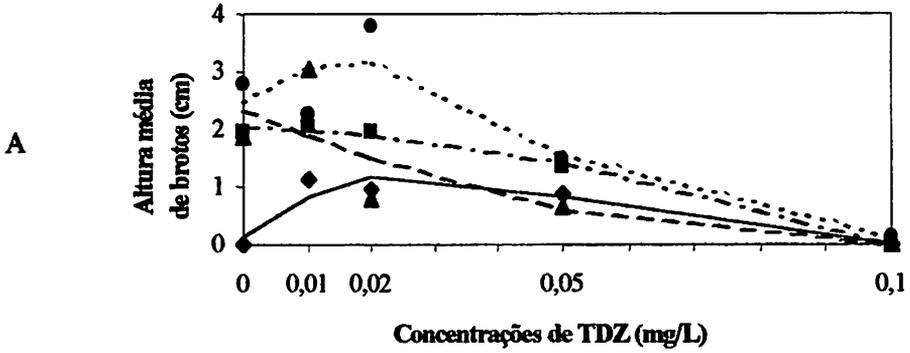
Esse pequeno número de brotos formados, em contraposição aos obtidos em outras espécies de bromeliáceas, reflete a dificuldade natural de *Alcantarea imperialis* em emitir brotações laterais.

Comparando-se os resultados, observa-se que o uso de TDZ em baixa concentração, 0,02 mg.L⁻¹ induziu a formação de maior número de brotos, 3,18 por explante, em contraposição ao 1,58 broto por explante formado quando se utilizou 1mg.L⁻¹ de BAP, ambos associados a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA.

4.3.3 Altura dos brotos formados

A altura média de brotos aumentou proporcionalmente às concentrações de ANA testadas, quando esse regulador foi aplicado isoladamente, até o nível de 0,5 mg.L⁻¹. Em concentrações superiores, a altura média dos brotos formados foi menor ou tendeu a se estabilizar (Figura 10). Pierik, Steegans e Hendriks (1984) já haviam constatado a eficiência do ANA para promover o crescimento dos brotos de bromeliáceas.

A associação de TDZ e ANA pareceu ser mais eficiente para o crescimento dos brotos, obtendo-se 3,78 cm de comprimento nos cultivados em 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ (Figura 10A e B). As equações das curvas da Figura 10 estão apresentadas na Tabela 3A do Anexo. Concentrações de ANA inferiores a 0,5 mg.L⁻¹, em associação com BAP ou TDZ, proporcionaram uma altura média de brotos de 1,4 cm. Acima dessa concentração, a associação de ANA com as citocininas induziu a formação de brotos de altura menor.



—●— ANA 0,0 mg/L -▲- ANA 0,1 mg/L ...●... ANA 0,5 mg/L -■- ANA 1,0 mg/L

FIGURA 10. Altura média de brotos de *Alcantarea imperialis* formados em meio de cultura adicionado de diferentes concentrações de TDZ (A) e BAP (B), associados ao ANA. UFLA, Lavras/MG, 1999

Apesar de o maior tamanho de brotos ter sido obtido na associação de 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA, o número de brotos formados foi menor nessa concentração de ANA. A utilização de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, na mesma concentração de TDZ, proporcionou maior número de brotos de altura ligeiramente inferior (2,0 cm). Esse crescimento de brotos de bromélias na presença de concentrações mais elevadas de ANA foi também observado por Mekers (1977) cultivando *Vriesea splendens*.

4.3.4 Entumescimento

As entumescências tenderam a ocorrer nos explantes cultivados na presença de auxina e citocinina ou, em alguns casos, em concentrações mais elevadas das citocininas BAP e TDZ, quando utilizadas isoladamente. No caso específico do experimento onde se avaliou o efeito de BAP e ANA, a incidência de entumescências não se enquadrou em modelos estatísticos que pudessem ser biologicamente explicados. Quando se utilizou BAP em qualquer concentração associado com ANA a 1,0 mg/L, a presença de entumescência ocorreu em 100% dos explantes (Figuras 11A e B). As equações estabelecidas para a Figura 11 estão apresentadas na Tabela 3A.

Na associação do TDZ com ANA, o número de explantes que apresentaram entumescimento foi crescente até a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ, quando houve 100% de explantes com protuberância.

O aparecimento de entumescências nos explantes de *Alcantarea imperialis* foi mais evidente no início do cultivo até os 60 dias. Ao final dos 120 dias, quando os explantes foram avaliados, as entumescências se confundiam com a emissão de brotações e ou com a formação de calos.

A presença dessa protuberância na base de vários tipos de explantes de bromélias já foi relatada por alguns autores (Mercier e Kerbauy, 1993, 1995; Carneiro, 1997), sendo por alguns denominados calos (Mathews e Ragan, 1982). Essa formação, no entanto, é bastante diferenciada da estrutura de calos, sendo mais parecidas com um entumescimento das células basais dos explantes. Cortes histológicos realizados por Carneiro (1997) indicam que essas estruturas não são compatíveis com calos, pois existe um sistema vascular visivelmente organizado.

Mais uma vez, pode-se observar que o entumescimento não interfere na emissão de brotações, porém aparece em um maior número de explantes quando se associa uma auxina à citocinina utilizada para indução de brotações, ou quando se aumenta a concentração de reguladores no meio de cultura.

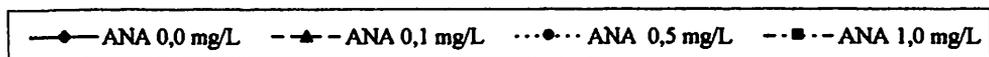
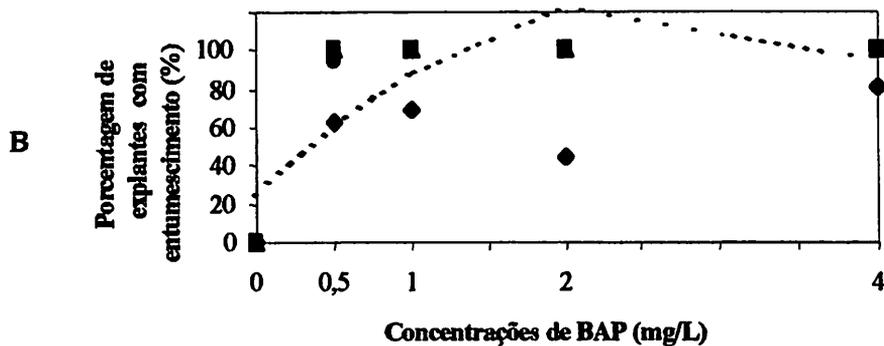
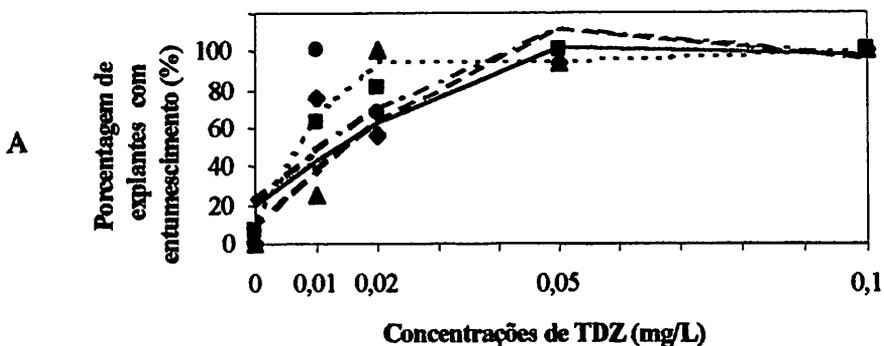


FIGURA 11. Porcentagem de explantes de *Alcantarea imperialis* com presença de entumescimento, cultivados em meio de cultura adicionado de diferentes concentrações de TDZ (A) e BAP (B), associados ao ANA. UFLA, Lavras/MG, 1999.

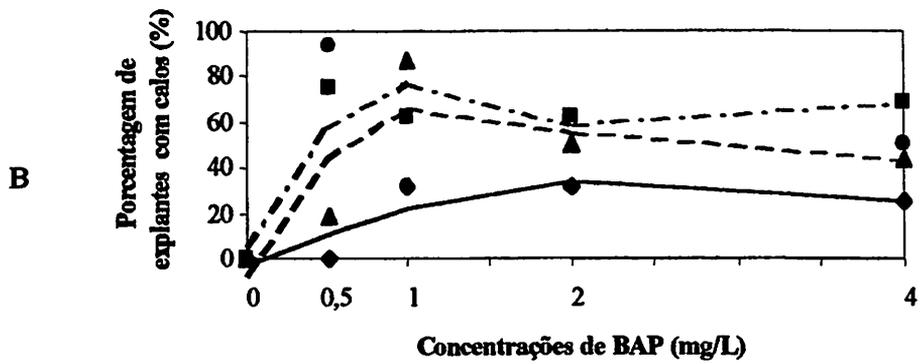
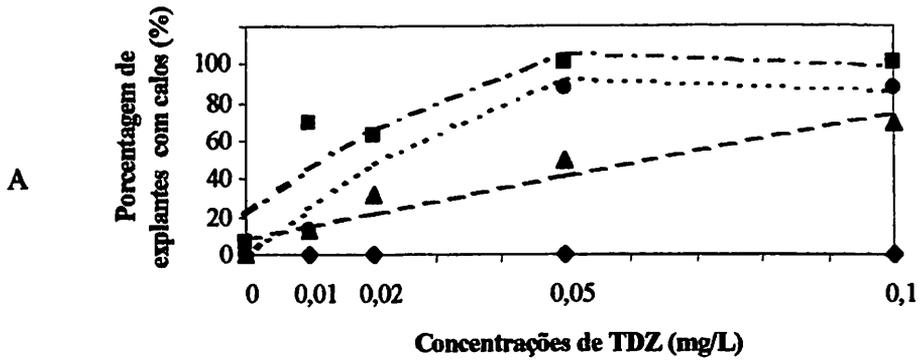
4.3.5 Ocorrência de calos

Observou-se presença de calos em todos os tratamentos nos quais se utilizou ANA, associado a qualquer uma das citocininas utilizadas, TDZ ou BAP.

A indução de calos pelo uso isolado de ANA foi inexpressiva. O TDZ também não induziu a formação de calos quando não estava associado ao ANA. Já a utilização de BAP na ausência de ANA induziu a formação de calos quando presente em concentrações superiores a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figuras 12A e B). As equações para as curvas da Figura 12 encontram-se na Tabela 3A do Anexo.

A associação de TDZ e ANA aumentou a ocorrência de calos nos explantes, proporcionalmente ao incremento das concentrações utilizadas. Quando se associou BAP e ANA, a formação de calos atingiu maiores valores nas concentrações 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, tendendo a diminuir ou a se estabilizar em concentrações maiores de BAP. Apesar da redução no número de explantes com ocorrência de calos, esses tenderam a ocorrer em maior volume nas maiores concentrações em comparação com os formados em níveis mais baixos.

As bromélias demonstram, em geral, facilidade na formação calos, quando cultivadas na presença de auxinas e citocininas, sendo esse fato também já observado por vários autores: Mercier e Kerbauf (1992, 1993, 1994, 1995), Vinterhalter e Vinterhalter (1994) e Carneiro (1997).



—◆— ANA 0,0 mg/L -▲- ANA 0,1 mg/L ...●... ANA 0,5 mg/L -■- ANA 1,0 mg/L

FIGURA 12. Porcentagem de explantes de *Alcantarea imperialis* que apresentaram calos quando cultivados em meio de cultura adicionado de diferentes concentrações de TDZ (A) e BAP (B), associados ao ANA. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.3.6 Altura média do explante inicial

O crescimento do explante inicial de *Alcantarea imperialis* foi inibido à medida que se elevaram as concentrações dos reguladores de crescimento BAP e TDZ, efeito esse já citado por George (1996). O alongamento foi estimulado pela presença de ANA, na ausência das citocininas ou em concentrações mais baixas (Figura 13A e B). Equações para as curvas dessa figura estão apresentadas na Tabela 3A do Anexo.

Quando o ANA foi utilizado isoladamente, o explante inicial cresceu de acordo com o aumento das concentrações da auxina, evidenciando o desenvolvimento precoce dos explantes de bromélias já relatado por Mekers (1977), na presença desse regulador. O crescimento do explante inicial foi inversamente proporcional à indução de brotações, formação de calos e entumescimento nos explantes.

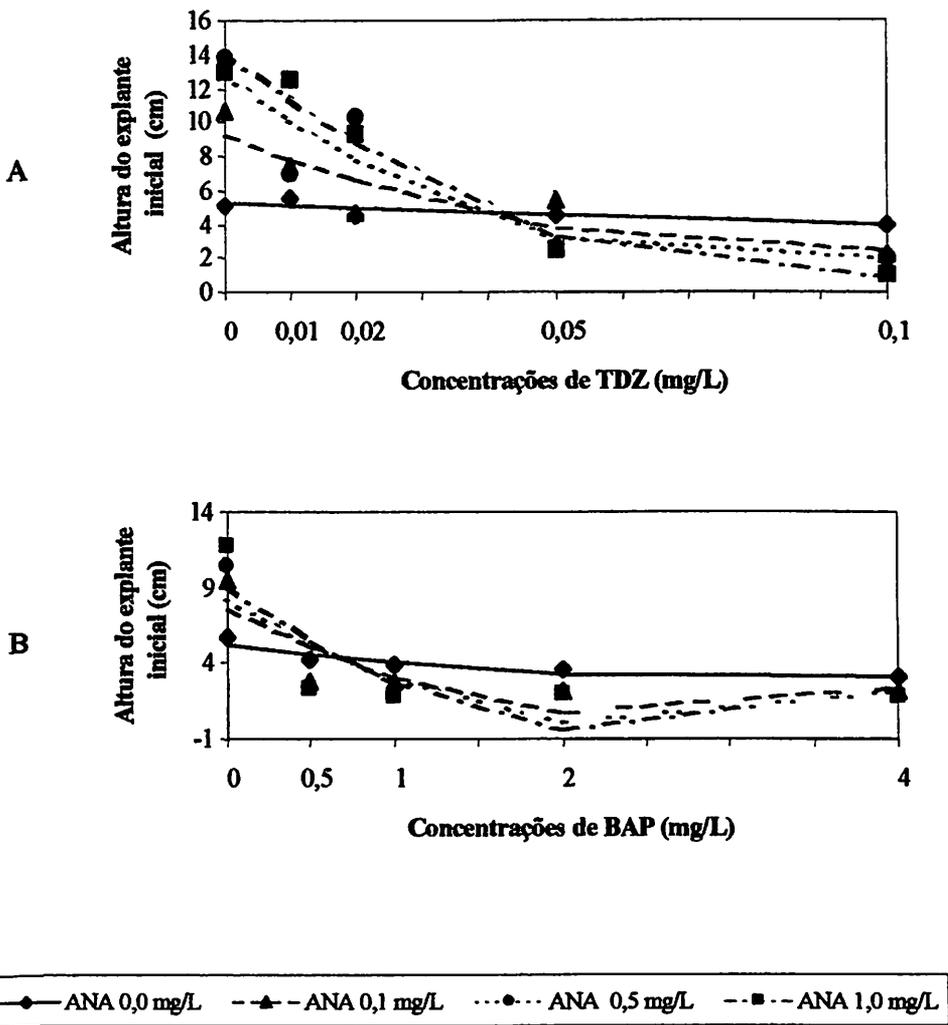
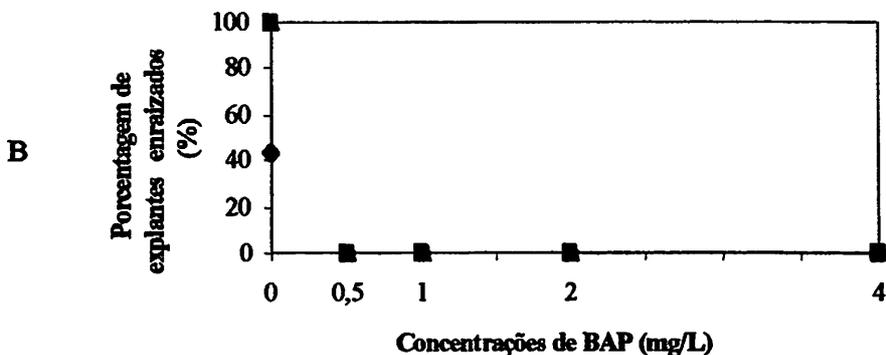
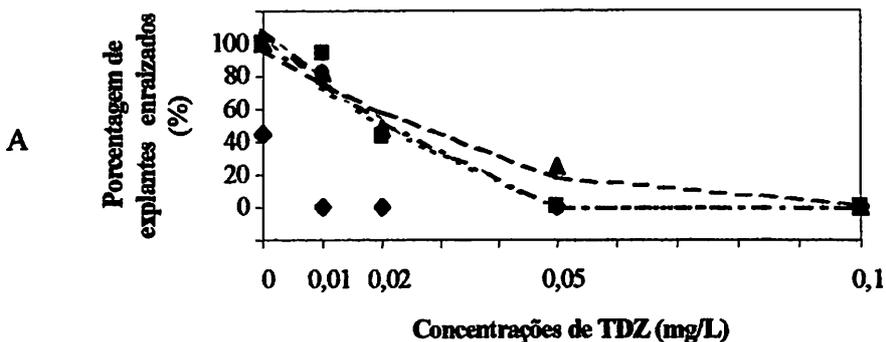


FIGURA 13. Altura dos explantes de *Alcantarea imperialis* cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de TDZ (A) e BAP (B), associados ao ANA. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.3.7 Enraizamento

Observa-se na Figura 14A ^{hora} a inibição da formação de raízes nos explantes cultivados em meio de cultura na presença de BAP e, ao contrário, foi estimulado pela presença de ANA.

Esse comportamento foi um pouco diferente quando se associou TDZ e ANA, ocorrendo uma menor inibição do enraizamento. Apenas nas concentrações mais elevadas de TDZ (0,05 e 0,1 mg.L⁻¹) ou na ausência de ANA houve completa inibição da formação de raízes (Figura 14B). As equações determinadas para as curvas da Figura 14 estão na Tabela 3A do Anexo.



—◆— ANA 0,0 mg/L -▲- ANA 0,1 mg/L ...●... ANA 0,5 mg/L -■- ANA 1,0 mg/L

FIGURA 14. Porcentagem de explantes de *Alcantarea imperialis* com formação de raízes em cultivo em meio de cultura adicionado de diferentes concentrações de TDZ (A) e BAP (B), associados ao ANA. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.4 Efeito do ANA sobre o enraizamento de brotos de *Alcantarea imperialis* cultivados *in vitro*

As brotações produzidas *in vitro*, na presença de BAP e TDZ associados ao ANA, não apresentaram formação de raízes. Na Tabela 5 encontram-se os resultados das análises de variância de todos os parâmetros analisados neste experimento.

TABELA 5. Resumo dos resultados das análises de variância dos parâmetros analisados no experimento de enraizamento de brotos de *Alcantarea imperialis* cultivados *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Causas da variação	GL	Porcentagem de brotos enraizados	Tamanho médio de raiz	Número médio de brotações	Altura média do broto
Concentrações de ANA	4	6125,000**	13,428**	8,393**	53,183**
Resíduo	15	1718,750	1,077	0,515	1,095
CV(%)		11,73	9,52	22,14	4,57

** Significativo a 1% de probabilidade

Esses brotos foram transferidos para meios com diferentes concentrações de ANA e, após 60 dias de cultivo, as plântulas já se encontravam bem desenvolvidas, ocorrendo formação de raízes em 100% dos brotos cultivados em meios com ANA, independente da concentração utilizada. No tratamento em que não se utilizou ANA, ocorreu o enraizamento de 56,25% das plântulas (Figura 15A). Carneiro (1997) não utilizou nenhuma auxina para

induzir enraizamento em *C. sinuosus*, *N. cruenta* e *Q. arvensis*, obtendo enraizamento cultivando-as somente em meio MS.

O ANA é a auxina normalmente utilizada para induzir enraizamento de brotos em cultura de tecidos. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a utilização de concentrações muito elevadas de auxina pode inibir a multiplicação e favorecer a formação de calos. Isso não ocorreu em qualquer das concentrações utilizadas neste experimento. O tamanho médio das raízes formadas aumentou até a concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, tendendo a se estabilizar acima desse valor (Figura 15B).

As plântulas de *Alcantarea imperialis* apresentaram ainda a formação de novos brotos, fator esse indesejável para plântulas nessa fase da produção, pois prejudica a conformação da planta, diminuindo a qualidade comercial da muda destinada à aclimatização (Figura 15C).

A concentração mais baixa de ANA utilizada neste experimento, $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, pode ser indicada como ótima, pois induziu o enraizamento em 100% dos brotos, com menor formação de brotações. O tamanho da plântula e das raízes não variou muito com o aumento na concentração de ANA (Figura 15D).

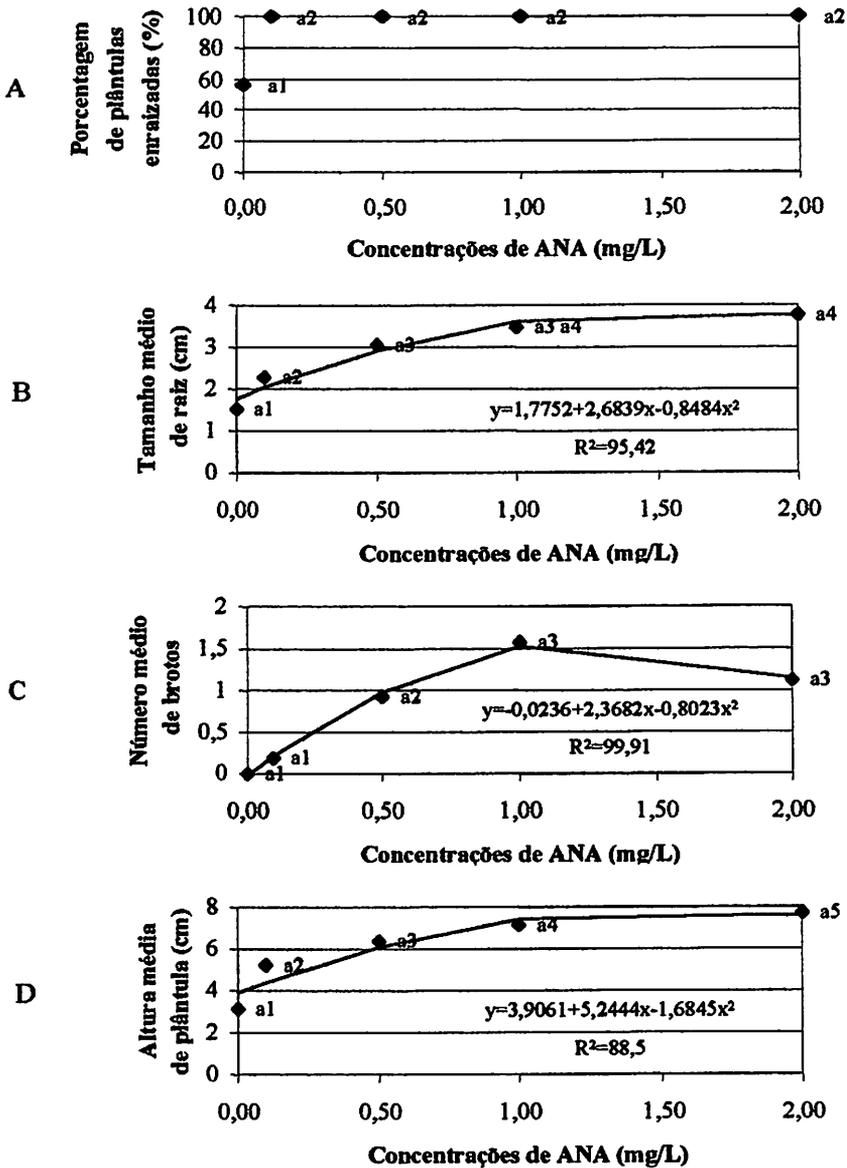


FIGURA 15. Efeito de diferentes concentrações de ANA sobre o enraizamento dos brotos (A), tamanho de raiz (B), número de brotos (C) e tamanho de plântula (D) de *Alcantarea imperialis*. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.5 Aclimatização

As plântulas demonstraram grande capacidade de adaptação ao ambiente *ex vitro*, confirmando a informação de Mercier e Kerbauy (1994). Dos brotos aclimatizados sem indução de enraizamento *in vitro*, 72% sobreviveram ao final de 30 dias, apresentando raízes incipientes, no substrato. Dentre os brotos já enraizados, houve uma sobrevivência de 98%, demonstrando a necessidade de se realizar enraizamento *in vitro* para proceder ao processo de aclimatização. Esse processo, apesar de aumentar o tempo de propagação em laboratório em 60 dias, proporciona pegamento de mudas superior, como pode ser observado na Figura 16.

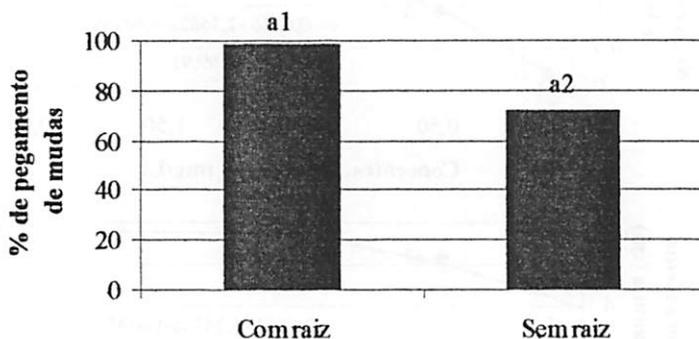


Figura 16. Porcentagem de pegamento de mudas de *Alcantarea imperialis* oriundas do cultivo *in vitro*, quando aclimatizadas com e sem raízes, após 30 dias. UFLA, Lavras/MG, 1999.

5 CONCLUSÕES

- A germinação de sementes de *Alcantarea imperialis*, realizada *in vitro*, reduz o tempo final desse processo em até 10 dias, além de produzir plântulas maiores, mais vigorosas e com boa conformação, quando comparado com a germinação convencional realizada em xaxim.
- A concentração ideal do meio MS para germinação de sementes é de 75% de sua composição original, desprovido de reguladores.
- Para a propagação e cultivo *in vitro* de *Alcantarea imperialis*, recomenda-se utilizar o meio MS em sua composição original;
- Para multiplicação dos brotos, o meio mais eficiente é o MS suplementado com 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ, associado a 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, que promoveu um maior número médio de brotos.
- A porcentagem de entumescimento não influencia a média de brotos emitidos, porém aumenta sua incidência com a elevação nas concentrações de reguladores de crescimento.
- O enraizamento dos brotos deve ser feito em meio MS suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA.
- A aclimatização de brotos já enraizados promove um índice de sobrevivência de 98%, em comparação com os 72% observados para brotos sem raízes.
- O tempo total de produção *in vitro* gasto neste protocolo é de 196 dias até o final da aclimatização. *In vivo*, as plântulas levam até um ano para atingir esse tamanho.
- Esse protocolo de propagação é uma alternativa bastante importante para produção de mudas de *Alcantarea imperialis*, tanto para o mercado de plantas ornamentais, como para programas de reintrodução em áreas degradadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENZING, D.H. *The biology of the Bromeliads*. Eureka: Mad River Press, 1980, 231 p.

BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da campina, *Acta Amazônica*, Manaus, v.7, n.3, p.73. 1977

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, Brasília: EMBRAPA, 1998, v.1, p. 103.

CALDAS, R.A.; CALDAS, L.S. Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme actives of Paul's Scarlet Rose callus. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.37, p.111-116, 1976.

CÂNDIDO, M.S.D. Cultivando *Chryphantus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias*, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p. 33-37, 1996.

CARNEIRO, L.A. Controle da morfogênese *in vitro* de três espécies de bromélias endêmicas do Sudeste brasileiro. Piracicaba: ESALq, 1997. 87p. (Tese - Doutorado em Agronomia).

COZAI, T.; KITAYA, Y. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. In: TERZI, M.; CELLA, R.; FALAVIGNA, A. (Ed) *Current Issues in Plant Molecular Biology*, London: Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 659-667.

DAVIDSON, S.E.; DONNAN, A. *In vitro* propagation of *Cryptanthus* spp. **Proceeding of the Florida State Horticultural Society, Orlando, v. 90, p. 303-304. 1977.**

DIJCK, R.V.; PROFT, M.; GREEF, J. Role of ethylene and cytokinins in the initiation of lateral shoot growth in bromeliads. **Plant Physiology, Bethesda, v.86, p. 836-840, 1988.**

DOSOLTO, R. Bromélias semeadas, bromélias preservadas. Entrevistador: Rose Aielo Blanco. **Jardim de flores. São Paulo. 2001. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/ECOLOGIA/bromelia1.html#topo1>>. Acesso em: 04 set. 2001**

FERREIRA, D., F. SISVAR. Versão 4.3 (Build 41). Lavras: UFLA/DEX, 1999. 4 disquetes.

FITCHET, M. Clonal propagation of queen and smooth cayenne pineapples. **Acta Horticulturae, Amsterdam, v.275,p.261-267, 1990.**

GATTI, A.C. Cultura de Tecidos em Plantas Ornamentais. In: UNIVERSIDADE DE MARINGÁ. **Manual de Floricultura, Maringá, 1992, p.28-35.**

GEORGE,E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture, part 1 – The technology. 2.ed. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574p.**

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos em Plantas**. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. Parte 2. p.99-169.

* GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p.183-260.

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

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. In vitro propagation of Bromeliads in liquid culture. *HortScience*, Alexandria, v. 15, n.5, p.603-604. 1980.

* JIMENEZ, R.M.; CABALLERO, M.R. El cultivo industrial de plantas en maceta. Reus: Ediciones de Horticultura,1990. 664p.

* JONES, J.B.; MURASHIGE, T. Tissue culture propagation of *Aechmea fasciata* and others bromeliads. *Proceeding of the Internacional Plant Propagators Society*, Copenhagen, v.24, p.117-123, 1974.

KAMPF, A. N. Argila expandida: um substrato para bromélias em vaso. *Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias*, Rio de Janeiro, v.2, n.3, p. 10-14, 1995.

KAMPF, A. N. Bromélias. In: UNIVERSIDADE DE MARINGÁ. **Manual de Floricultura**, Maringá, 1992, p. 210-211.

KAMPF, A.N. Substratos para floricultura. In: UNIVERSIDADE DE MARINGÁ. **Manual de floricultura**. Maringá, 1992. p. 36-43.

KAMPF, A.N. Aspectos da nutrição de Bromeliaceas epifitas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 3. 1990. Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1990. p.187-199.

KISS, E.; KISS, J.; GYGULAI, G.; HESZKY, L. E., A Novel Method for Rapid Micropropagation of Pineapple, **Hortscience**, Alexandria, v.30 (1), p.127-129, 1995.

LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélias na Natureza**, Rio de Janeiro, Marigo comunicação visual. 1993. 183p.

MATHEWS, V.H.; RANGAN, T.S. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant *in vitro* cultures of pineapple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.11, p.319-328, 1979.

MATHEWS, V.H., RAO P.S. *In vitro* regeneration in lateral bud explant of *Cryptanthus bromelioides* var. tricolor M. B. Foster. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 1, p.108-110. 1982.

MEKERS, O. *In vitro* proagation of some Tillandisioideae (Bromeliaceae). **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.78, p.311-317, 1977.

MELO, T.B. Bromélias no paisagismo. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p.3-7. 1996.

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

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

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic Brazilian bromeliad. *Botanic Gardens: Micropropagation News*, Orlando, v.1, n.6, p. 70-72. 1993.

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

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana*, Sarasota, v. 16, n. 2, p. 147-149. 1995.

* MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p.473-497, 1962.

NAVES, V. C.; PINTO, J. E. B. P. Aplicação do Thidiazuron na Indução de Brotações em Bromeliaceas, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, 14. 1996, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: UFSM, 1996. p. 109.

* NOVAES, V. Bromélias: a nova bossa de um compositor. *Manchete rural*, Rio de Janeiro, v. 6, p.72-5, 1993.

OLIVEIRA, M.G.N.; ROCHA, C.F.D.; BANGNALL, T. A comunidade animal associada à bromélia-tanque *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith. *Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias*, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.22-29, 1994.

NUNES, J., V., C.; FORZZA, R., C. Bromélias. **Projeto: Inventário dos recursos naturais da Mata Atlântica**, São Paulo, v. 1, n. 1, 1998. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nipe/rbma/bromain.htm>>. Acesso em: 04 set. 2001.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações- introdução: fundamentos básicos**. Lavras UFLA/FAEPE, 1997, 159p.

PIERIK, R. L. M.; SPRENKLENS, P. A. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. *Journal of the Bromeliad Society*, Los Angeles, v. 38,n. 2, p. 9-12. 1988

PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; HENDRIKS, J. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of in vitro-cultivated seedling of Bromeliaceae. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 24, p. 193-199.1984.

PIERIK, R.L.M.; SPRENKELS, P.A. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. *Journal of the Bromeliad Society*, Los Angeles, v.38, n.2, p.9-12, 1988.

QUINN, K. Planting media for bromeliads seeds, Part III. **Journal of the Bromeliad Society**, Los Angeles, v. 40, n.5, p. 213-221, 1990.

RAUH, W. **The bromeliad lexicon**. Blandford, London. 1990. 215 p.

REITZ, R. Plantas medicinais de Santa Catarina. **Anuário Botânico do Herbário Barbosa Rodrigues**, Florianópolis, v. 2, p. 39-84, 1983.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Simposium of Society for Experimental Biology**, London, v.11, p.118-1331, 1957.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Flora neotropica: Bromeliaceae**, New York: New York Botanical Gardens, v.14, n.2, p. 1268.1977.

SPURR, S.H.; BARNES, B.Y. **Forest Ecology**. New York, The Ronald Press, 1973, 571p.

THE BROMELIAD SOCIETY. **Bromeliads: a cultural handbook**. Arcadia. California: Kerr Printing Co, Arcadia.. 1977. 128 p.

TOMBOLATO, A.F.C.; TABEBAYASHI, S.S.G.; COSTS, A.M.M., QUIRINI, E.A. **Cultura *in vitro* da Bromélia**. **O Agrônômico**, Campinas, v.43, n.2/3, p. 77-78, 1991.

VINTERHALTER, B.; VINTERHALTER, D. True-to- the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 57, p. 253-263. 1994

WALL, B. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette, Chicago**, v.110, p. 605-613, 1988.

WANDERLEY, M., G., L. Beleza topical. Entrevistador: Luciane Crippa. **Natureza, São Paulo**, v. 156, n. 12, p. 14-21, jan. 2001. Entrevista.

ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. In vitro propagation of pineapple. **Hort Science, Alexandria**, v.31, n.1, p.127-129,1982.

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

ZORNIG, R.K. Micropropagação de bromélias. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias, Rio de Janeiro**, v.3, n.3, p.3-8, 1996.

ANEXOS

TABELA 1A. Composição do meio de cultura MS*

Sais	Quantidade (mg/L)
KH_4NO_3	1650,000
KNO_3	1900,000
H_3BO_3	6,200
KN_2PO_4	170,000
KI	0,830
$\text{NO}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,000
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,850
Tiamina-HCl	0,500
Ac. Nicotínico	0,500
Piridoxina	0,500
Glicina	2,000
Açúcar	30000,000
Ágar	7000,000

*Murashige e Skoog (1962)

TABELA 2A. Composição do meio de cultura Knudson modificado*

Sais	Concentração (mg/L)
Ca(NO₃)₂ . 4H₂O	1000,000
KH₂PO₄	250,000
MgSO₄ . 7H₂O	250,00
(NH₄)₂SO₄	500,000
Fe SO₄ . 7H₂O	25,000
MnSO . 4H₂O	7,500
H₃BO₃	0,056
NaMoO₄ . 2H₂O	0,016
CuSO	0,040
ZnSO₄ . 7H₂O	0,331
Açúcar	20000,000
Ágar	7000,000

***Campos (1996)**

TABELA 3A. Equações de regressão para as curvas das Figuras 8 a 14.

Figura	Legenda	Equação	R ² (%)
8A	—◆—	$Y=-1,332+4029,582x-109596,567x^2+694302,023x^3$	98,30
8A	--▲--	$Y=28,15027+1794,0532x-36059,6361x^2$	59,31
8A	...●...	$Y=63,9890+286,6365x-8868,4240x^2$	80,67
8A	--■--	$Y=60,9388+535,9816x-11628,5266x^2$	90,43
8B	—◆—	$Y=3,4615+32,4690x-7,5682x^2$	90,70
8B	--▲--	$Y=14,2305+164,9268x-115,9010x^2+18,4416x^3$	93,28
8B	...●...	$Y=65,3846-38,3995x+5,5211x^2$	95,17
8B	--■--	$Y=52,5000-37,13715x+6,0484x^2$	97,30
9A	—◆—	$Y=-0,0067+54,2789x-1521,8490x^2+9797,1356x^3$	99,76
9A	--▲--	$Y=0,2322+271,8889x-6781,239x^2+40392,569x^3$	99,67
9A	...●...	$Y=0,6855+162,858x-4553,989x^2+28624,043x^3$	80,27
9A	--■--	$Y=1,7047+6,7694x-236,7147x^2$	81,96
9B	—◆—	$Y=0,0433+0,4796x-0,1147x^2$	86,51
9B	--▲--	$Y=0,0922+3,0852x-2,055x^2+0,3195^3$	97,03
9B	...●...	$Y=1,1555-0,8531x+0,1419x^2$	89,32
9B	--■--	$Y=1,0874-0,9516x+0,1421x^2$	89,34
10A	—◆—	$Y=0,1111+90,5466x-2124,1430x^2+12078,7189x^3$	86,27
10A	--▲--	$Y=2,3378-45,8495x+224,5255x^2$	63,88
10A	...●...	$Y=2,4992+87,8144x-3132,6501x^2+20162,6675x^3$	84,87
10A	--■--	$Y=2,0393-3,9836x-165,5201x^2$	99,20
10B	—◆—	$Y=0,1500+2,8207x-1,6947x^2+0,2491x^3$	77,93
10B	--▲--	$Y=1,0786+0,5991x-0,2154x^2$	90,34
10B	...●...	$Y=1,8550-0,7746x+0,0777x^2$	99,87
10B	--■--	$Y=1,4507-1,1077x+0,1875x^2$	92,60
11A	—◆—	$Y=20,0051+2466,4176x-16844,6589x^2$	76,38
11A	--▲--	$Y=7,8051+3282,5699x-23933,7174x^2$	79,24
11A	...●...	$Y=12,538+6575,004x-139405,104x^2+824360,815x^3$	72,51
11A	--■--	$Y=21,7380+2854,8539x-20966,4377x^2$	88,21
11B	...●...	$Y=25,3846+79,3424x-15,4466x^2$	69,99
12A	—◆—	$Y=0$	
12A	--▲--	$Y=8,8957+665,6748x$	91,06
12A	...●...	$Y=-1,9167+2886,7488x-20002,4059x^2$	94,20
12A	--■--	$Y=21,1967+2618,2401x-18443,5816x^2$	86,18
12B	—◆—	$Y=-3,1731+30,3040x-5,8313x^2$	78,22

...continua...

TABELA 3A ...Cont...

Figura	Legenda	Equação	R ² (%)
12B	--▲--	$Y=-8,1218+137,9903x-74,9424x^2+10,9157x^3$	73,38
12B	--■--	$Y=5,6202+143,7957x-85,2426x^2+13,3140x^3$	84,84
13A	—◆—	$Y=5,1802-12,7837x$	67,82
13A	--▲--	$Y=9,3618-151,8612x+831,2386x^2$	79,66
13A	...●...	$Y=12,7801-277,9749x+1699,4019x^2$	82,75
13A	--■--	$Y=14,1679-301,7149x+1683,5978x^2$	96,91
13B	—◆—	$Y=5,2702-1,4607x+0,2314x^2$	87,23
13B	--▲--	$Y=7,6767-5,6097x+1,0691x^2$	72,41
13B	...●...	$Y=8,2134-6,5496x+1,2565x^2$	69,53
13B	--■--	$Y=9,1116-7,8136x+1,5217x^2$	67,67
14A	--▲--	$Y=96,9445-2207,0814x+12504,0098x^2$	95,69
14A	...●...	$Y=102,8550-3112,0348x+20837,7887x^2$	98,92
14A	--■--	$Y=107,6067-3205,2302x+21262,1632x^2$	95,92