

ELISA MITSUKO AOYAMA

**Propagação *in vitro* e em estufa de
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms
(Bromeliaceae) a partir de sementes**

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

SÃO PAULO

2010

ELISA MITSUKO AOYAMA

**Propagação *in vitro* e em estufa de
Alcantarea imperialis (Carrière) Harms
(Bromeliaceae) a partir de sementes**

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

ORIENTADORA: DRA. SOLANGE CRISTINA MAZZONI-VIVEIROS

CO-ORIENTADORA: DRA. CATARINA CARVALHO NIEVOLA

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Aoyama, Elisa Mitsuko
A638p Propagação *in vitro* e em estufa de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms
(Bromeliaceae) a partir de sementes / Elisa Mitsuko Aoyama -- São Paulo, 2010.
144 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2010
Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Anatomia. 3. Micropropagação. I. Título

CDU: 582.564

“Quando a gente pensa que sabe
todas as respostas,
vem a vida e muda as perguntas...”

Sócrates

“Três regras básicas:

1 - No caos está a simplicidade

2 - No conflito está a harmonia

3 - No meio da dificuldade

está a oportunidade”

Albert Einstein

“There needs to be
passion behind what you´re
doing or it´s not worth it!”

Lisa Edelstein

Dedico,

Aos meus pais Cleuza e Takao,
e aos meus irmãos Takao e Eloisa.

Agradecimentos

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de Doutorado.

Ao Instituto de Botânica por disponibilizar as dependências para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Botânica pela oportunidade de participar do curso e desenvolver este projeto, principalmente às coordenadoras Dra. Sonia M. C. Dietrich e Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, sempre dispostas a me auxiliar em todos os momentos.

Agradeço à Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, pela orientação, pelo bom convívio e paciência durante a execução do projeto e por acreditar em meu trabalho.

À Dra. Catarina Carvalho Nievola, pela co-orientação, pelo apoio e amizade, pelos conhecimentos transmitidos e valiosas sugestões indispensáveis à elaboração e desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Eduardo Pereira Cabral Gomes, pelas valiosas sugestões na estatística dos dados do presente trabalho.

Ao Luciano Coelho Rodrigues, pelo auxílio na estatística dos dados do presente trabalho, pelo apoio e amizade.

À Dra. Jane Elizabeth Kraus pelo empréstimo de bibliografias, pelas sugestões dadas durante o desenvolvimento do projeto, pelo apoio e amizade.

À Dra. Adriana Mascarette Labinas pelas valiosas sugestões, revisão do abstract, amizade, apoio, companheirismo, incentivo e preocupação durante todas as etapas do doutorado.

À Dra. Maria Angela M. Carvalho e M.Sc. Vanessa Fátima de Oliveira, pelas informações sobre os cálculos de taxa de crescimento.

Ao Dr. Marcos Pereira M. Aidar e M.Sc. Sabrina Costa Ribeiro Latansio-Aidar, pelas sugestões e pelo empréstimo do radiômetro.

À colega Fernanda Karstedt, pela amizade, apoio, dicas de informática e auxílio na confecção das pranchas.

Ao colegas Leonardo M. Versieux e Luciana Fiorato, pelo empréstimo de bibliografias e valiosas sugestões.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Jane Elizabeth Kraus, Dra. Vivian Tamaki e Dr. Marco Aurélio Tiné, pelas valiosas contribuições.

À Dra. Regina Maria Monteiro de Castilho pela amizade e pelas primeiras lições de anatomia vegetal.

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais - Dra. Vivian Tamaki, Dr. Shoey Kanashiro, Dra. Vanessa Rebouças dos Santos e Dr. Clóvis José F. de Oliveira Jr. - e às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisa em Anatomia do Instituto de Botânica - Dra. Agnes Elisete Luchi, Dra. Adriana Hissae Hayashi, Dra. Edenise Segala Alves, pelo empréstimo dos equipamentos, pelos conhecimentos transmitidos e pela excelente convivência.

A Maria Manoel - funcionária do Núcleo de Pesquisa em Anatomia do IBt, pela amizade, atenção, preocupação, carinho e apoio dispensados em todas as etapas do doutorado.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais - Ivomar Aparecido Medina, Cleonice Righetti de Campos, Dona Luzia Rodrigues Scarpeta, pela boa convivência.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Botânica, em especial à Bibliotecária Maria Helena Simões Costa Fernandes Gallo, pela atenção e bom atendimento.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação, em especial Márcia Regina Ângelo e Antonio Aparecido Carlos Borges, pela atenção e bom atendimento prestado.

Ao alojamento do Instituto de Botânica, em nome da funcionária responsável Dinorah Evangelista, pela boa condição de moradia e aos colegas do alojamento, em especial a Katya da Silva Patekoski, Luana Patricia Delegá, Fernanda Karstedt, Janaina Maria Gonçalves dos Santos, Camila Malone, Simone Wengrat, Luciana Giacomini, Simone Silva, Cristiane Nascimento pela amizade, bons momentos e experiências compartilhados.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia - Andrea Nunes Vaz Pedroso, Fernanda Tresmondi, Marcos J. Kitaura, Aline Delgado Pinheiro, Renata D'Agostino, Diana R. Yamaguti, Cynthia Hering Rinnert, Marcos Pedroso e Barbara B. Moura - e do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais - Daniela Soares dos Santos, Flavia Maria Kazue Kurita, Luciana Mollo, Luciana Cabral,

Rosmari Lazarini, Camila Pereira de Carvalho e Sabrina Vanessa de Andrade, pelo bom convívio, pela troca de informações e amizade.

Ao amigo Alexandre Indriunas, pelas sugestões, no auxílio pela busca por bibliografias, atenção, paciência e pelo companheirismo, principalmente nos momentos finais do trabalho.

À amiga Katya da Silva Patekoski pela amizade, pela companhia, por me ouvir nos momentos difíceis de muito estresse, pela preocupação constante, pelos momentos de muitas risadas e muita música.

À amiga Luana Patricia Delegá, pela amizade, pelas conversas, pelos passeios por São Paulo e momentos de descontração.

Às amigas Luciana Costa Santos, Bárbara Helena Ramos e Gabriela Dávila Ribeiro, pela amizade e companheirismo.

Às colegas Carolina Tiharu Kuriyama, Kesia Tiaki Kimoto e Diana Rasquinha Yamaguti, por compartilhar o apartamento no período de adaptação em São Paulo, pela companhia e momentos de diversão.

Ao colega Jorge Luiz Marx Young, pelo apoio, companheirismo e momentos de descontração.

Aos colegas Gabriel de Castro Vasconcellos Saenz, Renata Maria Pires Burin, Fernanda Cristiane Simões Neri, pela amizade e apoio durante o primeiro ano de Doutorado.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!!!!

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. BROMELIACEAE	1
I.2. A ESPÉCIE <i>Alcantarea imperialis</i> (CARRIÈRE) HARMS	12
I.3. PROPAGAÇÃO DE BROMELIACEAE	20
I.3.1. Propagação por semente	20
I.3.2. Micropropagação	22
I.4. CRESCIMENTO	25
I.5. ACLIMATAÇÃO	27
I.6. ANATOMIA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS	29
II. OBJETIVO	32
III. MATERIAL E MÉTODOS	32
III.1. COLETA E PREPARAÇÃO DAS SEMENTES	31
III.2. EFEITO DA LUZ NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES	35
III.3. ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL	36
III.4. COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO E ANATOMIA DAS PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>, EM ESTUFA E ACLIMATADAS	36
III.4.1. Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> a partir de semente	36
III.4.2. Estabelecimento do cultivo em estufa a partir de semente	37
III.4.3. Aclimação: estabelecimento do período “ <i>in vitro</i> ” adequado	39
III.5. COLETA	39
III.6. PARÂMETROS AVALIADOS	40
III.6.1. Análise biométrica	40
III.6.2. Determinação de massa	39
III.6.3. Determinação do teor de clorofila e de carotenóides	40
III.6.4. Índice de Suculência da parte aérea	41
III.6.5. Análise de Desenvolvimento	41
III.6.6. Análise estrutural	42
III.6.6.1. Anatomia foliar de plantas adultas	42
III.6.6.2. Anatomia foliar de plantas cultivadas <i>in vitro</i> e em condições de estufa	43
III.7. ANÁLISE DE DADOS	44
IV. RESULTADOS	45

IV.1. EFEITO DA LUZ NA GERMINAÇÃO	45
IV.2. DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL	46
IV.3. COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO E ANATOMIA DAS PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E EM CONDIÇÕES DE ESTUFA	48
IV.4. COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E APÓS O PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO	74
V. DISCUSSÃO	88
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
VII. RESUMO.....	109
VIII. ABSTRACT.....	113
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
X. ANEXOS.....	144

I. INTRODUÇÃO

I.1. BROMELIACEAE

A família Bromeliaceae compreende, aproximadamente, 60 gêneros e 3170 espécies (Luther 2008), que ocorrem preferencialmente nas zonas tropicais (Leme 1997a, Paula & Silva 2001, Souza & Lorenzi 2005), estendendo-se desde o sul da América do Norte, passando pela América Central até chegar à região da Patagônia na América do Sul. Apenas uma espécie é referida para o continente africano na região da Guiné, *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed (Reitz 1983, Jacques-Félix 2000).

Os dois maiores centros de diversidade da família são o leste do Brasil e a região dos Tepuis, na Venezuela. O Brasil detém um elevado número de representantes de Bromeliaceae, estimando-se a ocorrência de cerca de 70% dos gêneros e 40% das espécies, distribuídos especialmente na região Sudeste (Wanderley & Martins 2007).

Entre as características que definem a família, torna-se importante ressaltar algumas peculiaridades existentes em cerca de 50% das espécies de bromélias, como a disposição das folhas no eixo caulinar, apresentando uma sobreposição parcial entre elas e formando os denominados “tanques” ou “cisternas” revestidos por tricomas peltados na forma de escamas absorventes, que variam em forma e proporção, onde se acumula a água da chuva ou de irrigação (fitotelma) e detritos, indispensável aos processos de nutrição da maioria das bromélias (Benzing & Burt 1970). Devido à capacidade de reter água e nutrientes, o tanque foi considerado como um substituto do solo, pois a água acumulada, além da matéria orgânica em decomposição, pode ser absorvida pelas folhas através das escamas (Tomlinson 1969, Benzing 1976, Benzing *et al.* 1978).

As bromélias habitam, assim, desde áreas litorâneas até altitudes acima de 3.000 metros; de regiões de alta umidade relativa do ar a extremamente secas. Crescem em

locais sombrios, como o interior de matas, ou muito ensolarados, como rochas à beira mar (Reitz 1983, Paula & Silva 2001). As adaptações morfofisiológicas, permitem que as bromélias vivam em ambientes, frequentemente, oligotróficos e sujeitos ao ressecamento (Leme & Siqueira Filho 2006), como o tanque, as escamas, que além da capacidade de absorção de água e nutrientes refletem a luz (Benzing 1980, 2000), o metabolismo CAM (Crayn *et al.* 2004, Schulte *et al.* 2005), a suculência (Kluge & Ting 1978), a resistência ao fogo, entre outras.

A família reúne plantas na sua maioria herbáceas, perenes, terrestres, epífitas ou rupícolas, com caule reduzido, portadoras de folhas longas dispostas em rosetas e densamente imbricadas na base (Schultz 1990, Judd *et al.* 1999, Souza & Lorenzi 2005, Wanderley & Martins 2007). As folhas podem apresentar bainha aberta, pouco ou muito distinta da lâmina e, geralmente, de consistência mais delicada, com margem em geral inteira ou serrilhada a espinescente; lâmina coriácea, carnosa até membranácea, verde, acinzentada, avermelhada a vinácea, algumas vezes alva, com ou sem ornamentações de diferentes cores em forma de estrias, faixas ou máculas, desde filiforme a muito alargada, com ápice muito variável, margem inteira ou serrilhada a fortemente espinescente (Wanderley & Martins 2007).

A família se encontra incluída na Ordem Poales (APG III 2009) e tradicionalmente é dividida em três subfamílias, distinguíveis pelo tipo de hábito e pelas características morfológicas, como posição do ovário e tipo de fruto e semente (Smith & Downs 1974, 1977, 1979). Pitcairnioideae reúne plantas terrestres, com muitas das espécies sobre rochas e poucas epífitas, geralmente portadoras de folhas com espinhos nas margens, ovário súpero, fruto cápsula e semente com apêndices não plumosos (Smith & Downs 1974). Em Tillandsioideae, as plantas são essencialmente epífitas e apresentam folhas de margens inteiras, ovário súpero, fruto cápsula e sementes plumosas (Smith & Downs 1977). Em Bromelioideae, as plantas são, na sua maioria,

epífitas e apresentam folhas com margens serrilhadas ou espinoscentes e dispostas em rosetas formando os tanques, enquanto o ovário é ínfero, o fruto baga e as sementes lisas, sem apêndices (Smith & Downs 1979).

Análises filogenéticas recentes confirmam que Bromelioideae e Tillandsioideae são monofiléticas (Crayn *et al.* 2000, Horres *et al.* 2000, Barfuss *et al.* 2005, Schulte *et al.* 2009, Sass & Specht 2010) e que Pitcairnioideae é polifilética (Crayn *et al.* 2000, Horres *et al.* 2000), tanto que foi proposto por Givnish *et al.* (2004) e Givnish *et al.* (2007) a divisão de Pitcairnioideae em seis subfamílias.

Para as espécies de bromélias formadoras de tanque, a importância das raízes tem sido atribuída à função de fixar a bromélia à planta hospedeira, tendo pouca ou nenhuma contribuição na aquisição de nutrientes. Portanto, as bromélias formadoras de tanque seriam capazes de adquirir os elementos minerais, preferencialmente, por absorção foliar (Benzing 1976, Benzing *et al.* 1978).

Além disso, a água acumulada no tanque é um reservatório para diversos animais, desde larvas de insetos até aves e mamíferos, que podem utilizá-la como fonte de água, alimento, abrigo ou sítio de acasalamento (Oliveira *et al.* 1994, Oliveira & Rocha 1997, Rocha *et al.* 1997, Teixeira *et al.* 2006, Chan *et al.* 2007, Frank & Lounibos 2009). Alguns animais desenvolvem seu ciclo de vida exclusivamente nesta água, como o crustáceo *Elpidium bromeliarum* Müller, 1880 (Reitz 1983). Já outros utilizam esta água eventualmente, como sapos, pererecas, gambás, etc. Segundo Rocha *et al.* (2004), por causa do acúmulo de água dentro dos tanques, organismos vivem a seu redor, dessa forma as bromélias funcionam como um amplificador da biodiversidade e ao serem destruídas afetam outros organismos. Manter espécies de bromélias nos seus ambientes significa, não apenas conservar as espécies de bromélias *per se*, mas sim, conservar uma ampla gama da diversidade local.

Em conseqüência, a riqueza e a abundância de espécies de bromélias em um determinado bioma podem ser utilizadas para estimar o *status* de conservação do ambiente e a capacidade de suporte da biodiversidade (Leme & Marigo 1983). O fato de mais da metade das espécies da família ser epífita obrigatória ou facultativa ressalta a relevância de seu papel biológico, à medida que essas plantas criam no interior das florestas nichos ecológicos em diversos patamares, bem acima do solo. Soma-se a isso o grande contingente de espécies rupícolas, que tornam “habitáveis” as superfícies rochosas totalmente expostas e desprovidas de solo, inclusive as verticais (Leme & Siqueira Filho 2006).

A anatomia e a fisiologia das espécies de Bromeliaceae são bastantes particulares devido à presença de adaptações ecológicas, que consistem, fundamentalmente, na progressiva redução estrutural e funcional das raízes e no desenvolvimento concomitante de estruturas foliares características, tais como parênquima armazenador de água, tecidos de sustentação e principalmente as escamas, caráter de maior relevância (Tomlinson 1969, Braga 1977, Benzing 1980, 2000).

Dentre os estudos anatômicos realizados com Bromeliaceae merecem destaque alguns trabalhos de cunho descritivo, como o de Billings (1904) com órgãos vegetativos e reprodutivos de *Tillandsia usneoides* L., os de Krauss (1948, 1949a, 1949b) e o de Okimoto (1948) que relatam as características morfoanatômicas dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Ananas comosus* (L.) Merril, respectivamente, e ainda o de Robinson (1969) que descreve a anatomia foliar de representantes dos gêneros *Connelia*, *Cottendorfia* e *Navia* (Pitcairnioideae). Tomlinson (1969), numa revisão anatômica abrangente, descreve de forma detalhada a estrutura dos órgãos vegetativos, principalmente da folha, como a estrutura dos tricomas foliares, dos estômatos e do mesófilo.

Estudos sobre a anatomia foliar de bromélias, presentes em diferentes ambientes, têm sido realizados com o propósito de melhor compreender a variabilidade adaptativa observada na família. Entre eles destacam-se: o trabalho de Flores (1975), com espécies de região árida e de floresta tropical úmida; o de Braga (1977), com espécies da campina amazônica; o de Brighigna *et al.* (1984), que investiga a função de certas características estruturais presentes em espécies de *Tillandsia*, procedentes de ambientes áridos e bastante úmidos; o de Gómez & Winkler (1991), sobre bromélias que ocorrem em áreas de mangue e fora dele; o de Souza & Neves (1996), que separa espécies de *Tillandsia*, morfologicamente semelhantes entre si, que ocupam ambientes extremos; o de Arruda & Costa (2003), com espécies de *Vriesea* de ambientes xéricos, que possuem hábito epifítico e saxícola; o de Segecin & Scatena (2005), sobre espécies de *Tillandsia* que ocorrem em matas ciliares ou crescem em afloramentos rochosos; os de Proença & Sajo (2007, 2008), sobre anatomia dos órgãos vegetativos de espécies ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo; o de Lobo (2007) e Voltolini *et al.* (2009), sobre morfoanatomia de espécies de bromélias denominadas reófitas, como *Dyckia brevifolia* Baker e *Dyckia distachya* Hassler.

Outros estudos analisaram a estrutura foliar com ênfase nas modificações que ocorrem na transição entre as fases juvenil e adulta, principalmente com espécies de Tillandsioideae que apresentam tanque (Benzing & Renfrow 1971, Adams III & Martin 1986a, 1986b, Reinert & Meirelles 1993, Schmidt & Zotz, 2001). Para *Vriesea geniculata* (Wawra) Wawra as principais características observadas nos indivíduos juvenis foi a maior densidade de escamas e a menor densidade de estômatos (Reinert & Meirelles 1993).

As escamas, também denominadas de tricomas peltados, têm sido investigadas há muito tempo com objetivos diversos, entre eles podemos citar os trabalhos sobre a estrutura, função e importância ecológica dessas estruturas, tanto no papel de absorção

(Benzing & Burt 1970, Benzing 1976, Benzing *et al.* 1976, Benzing *et al.* 1978, Sakai & Sandford 1980, Pierce *et al.* 2001, Ohruí *et al.* 2007) como na proteção dos raios solares (Pierce 2007). Alguns trabalhos analisam a estrutura das escamas com fins taxonômicos, como o de Strehl (1983), que comparou a forma e distribuição das escamas de 100 espécies de bromélias, o de Varadarajan & Gilmartin (1987) com espécies de Pitcairnioideae, o de Mosti *et al.* (2005) com espécies de *Tillandsia*, o de Fiorato (2009) com espécies de *Tillandsia* do Estado da Bahia.

As escamas são constituídas de um pé e um escudo, desempenham importante papel na economia hídrica das bromélias, auxiliando na sobrevivência do espécime sob substratos secos e/ou oligotróficos, epifíticos, epilíticos ou terrestres (Benzing 1980, 2000). Elas podem variar quanto à forma, tamanho e disposição na folha. De modo geral, são mais simples nas espécies terrestres, especialmente da subfamília Pitcairnioideae, um pouco mais elaborados em Bromelioideae e, finalmente, mais especializados nas Tillandsioideae (Tomlinson 1969, Benzing 1980, 2000).

Nas plantas terrestres sem tanque há maior concentração de escamas na face inferior das folhas, a absorção é feita pelas raízes e as escamas servem, fundamentalmente, para proteger contra a transpiração excessiva, já que cobrem os estômatos e aumentam a refletância dos raios solares (Benzing 1980). Nas espécies cuja roseta forma tanque e possuem raízes ainda funcionais, as escamas estão em geral mais concentradas na bainha foliar, como nas epífitas de Bromelioideae. As raízes atuam mais na fixação e as escamas já são mais especializadas, com alguma distinção entre as células do disco e as da ala, sendo as últimas concêntricamente dispostas. A maior especialização ocorre nas Tillandsioideae, onde as raízes são quase inexistentes ou totalmente ausentes, como no caso de muitas espécies de *Tillandsia* (figura 1) (Benzing 1980, 2000).

Segundo Mantovani & Iglesias (2005), em estudo sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântula de três espécies de bromélias terrestres, o aparecimento de escamas ocorre ainda na primeira folha, o que poderia favorecer seu estabelecimento em substratos mais secos e iluminados.

Outros trabalhos foram realizados com plântulas de bromélias tendo como enfoque fornecer informações para a taxonomia, dentre eles, destacam-se: o de Pereira (1988), sobre a morfologia do desenvolvimento pós-seminal de 56 espécies da subfamília Bromelioideae, fornecendo informações sobre a germinação e as principais fases do desenvolvimento pós-seminal, além de apresentar um glossário relativo à terminologia empregada; o de Scatena *et al.* (2006), que observaram o desenvolvimento pós-seminal e a morfologia da semente de três espécies de *Tillandsia*; o de Pereira *et al.* (2008), cujo estudo demonstrou que a morfologia de sementes e o desenvolvimento pós-seminal constituem ferramentas úteis para estudos taxonômicos, ecológicos e de tecnologia de sementes.

A família Bromeliaceae apresenta uma longa história de uso etnobotânico, associada aos povos americanos nativos, como fonte de fibras, alimentos, forragens e medicamentos, além de uso ornamental e místico (Bennett 2000).

Trata-se de uma família que agrupa gêneros de importância econômica para uso alimentício, como o fruto de *Ananas comosus* (L.) Merrill (abacaxi) e de *Ananas bracteatus* (Lindley) Schultes f., usado como sobremesa e no preparo de diversos produtos (Camargo 1943, Reitz 1983, Rohrbach *et al.* 2003).

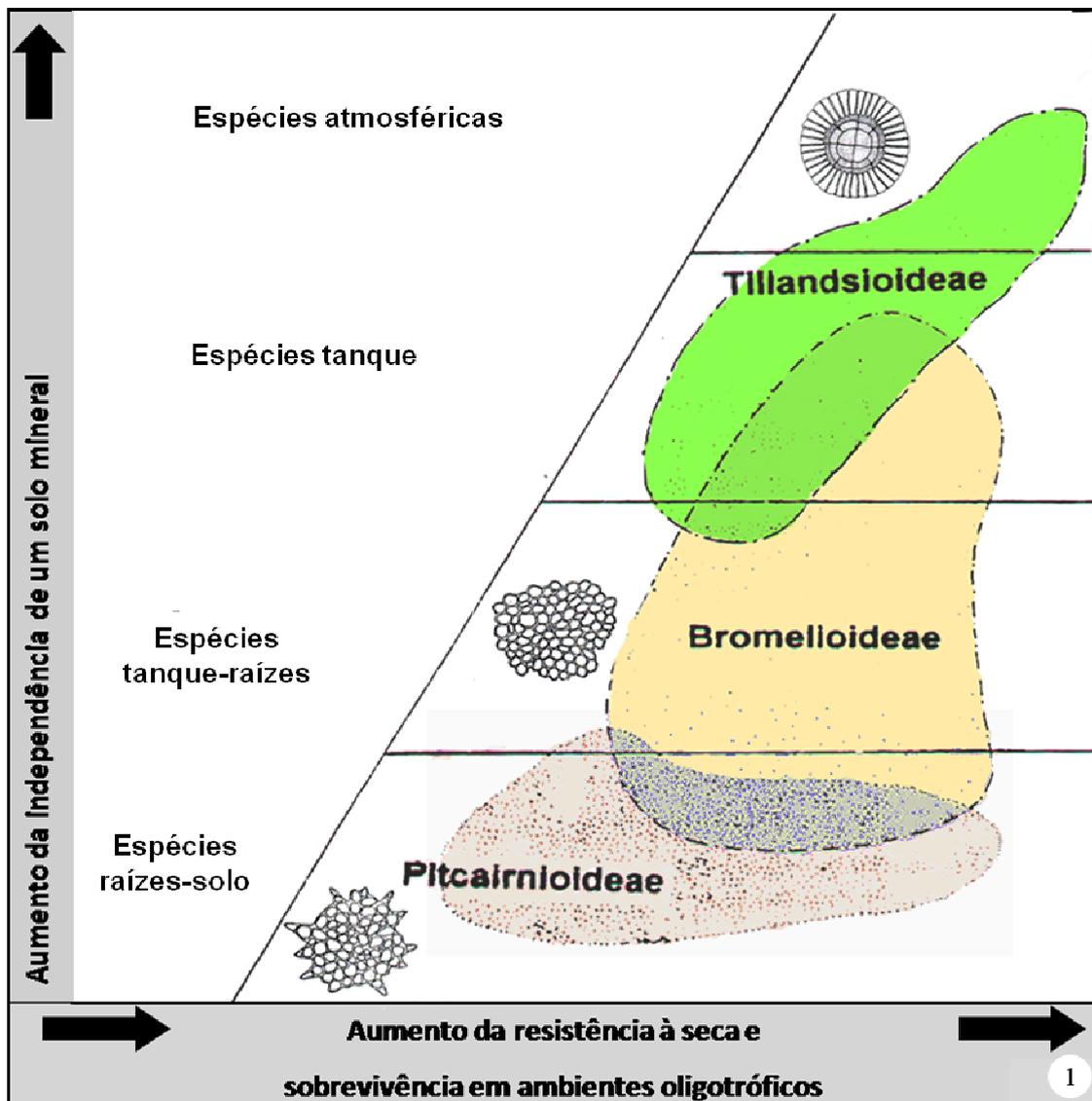


Figura 1. Esquema da classificação ecológica das espécies de Bromeliaceae segundo a ocupação no ambiente, modificado de Benzing & Burt (1970) e Benzing (1980).

Além de ser empregado como alimento, o abacaxi também é bastante utilizado na medicina popular. Ele apresenta reconhecidas propriedades medicinais, agindo principalmente como estomáquico, carminativo, diurético e antiinflamatório, sendo também indicado para problemas das vias respiratórias e para neurastenia (Albuquerque 1989 *apud* Lorenzi & Matos 2008).

Os frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. (caraguatá) são aplicados como antihelmíntico, purgativos, diuréticos, contra a tosse, asma, bronquite, enquanto o chá das folhas pode ser utilizado no tratamento de afecções da mucosa bucal (Reitz 1950, Fenner *et al.* 2006, Lorenzi & Matos 2008). Análises fitoquímicas da planta indicaram a presença de saponinas, taninos, mucilagens e possivelmente da enzima ativa bromelina (Lorenzi & Matos 2008).

A espécie *Tillandsia usneoides* L. (barba de velho) possui uma resina, denominada cumarina ou ácido resinoso aromático, sendo utilizada no tratamento de reumatismo, hemorróidas, hérnia, males do estômago, casos de flatulência, inflamação do fígado, doenças pulmonares e cardíacas (Reitz 1950). Espécies de *Ananas*, *Bromelia* e *Pseudoananas* são consideradas antihelmínticas, além de serem usadas contra a ancilostomíase duodenal, tosses em geral, contra aftas e afecções da mucosa (Hoehne 1939).

Algumas espécies de Bromeliaceae foram e estão sendo estudadas química e farmacologicamente e, com isto, muitos compostos foram isolados e identificados. Diferentes classes de compostos orgânicos existentes nessas espécies foram relatadas, incluindo triterpenos, esteróides, flavonóides, derivados de ácidos cinâmicos, gliceróis, entre outros, com interessante potencial químico e farmacológico a serem descobertos (Manetti *et al.* 2009).

Na indústria utilizam-se, como fonte de fibras para cordoaria e tecidos grossos, folhas de *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez. (caroá) e *Ananas lucidus* Mill (curaguá) (Medina 1959) e de curauá (*Ananas erectifolius* L.B.Smith), da região amazônica, em substituição à fibra de vidro (Mothé & Araújo 2004).

Além disso, várias bromélias, especialmente dos gêneros *Aechmea*, *Ananas*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Quesnelia*, *Guzmania*, *Alcantarea*, *Vriesea* e *Bilbergia*, destacam-se pela sua importância no aspecto ornamental, apresentando inflorescências, brácteas e folhagens extremamente vistosas e coloridas (Reitz 1983, Rouse 1992, Leme & Marigo 1983, Melo 1996, Souza & Lorenzi 2005).

Embora a ocorrência original das bromélias seja atribuída às Américas, notadamente à costa brasileira, os países que mais as comercializam como plantas ornamentais são Bélgica, Alemanha, Holanda, Japão e Austrália (Paula & Silva 2001, Kiyuna *et al.* 2004). No Brasil, a utilização das espécies formadoras de tanque, em projetos paisagísticos de decoração de interiores vem sendo difundida com grande sucesso. No entanto, muitas dessas plantas são oriundas do extrativismo ilegal (Nahoum 1994, Andrade & Demattê 1999, Rocha *et al.* 2004).

A produção de bromélias em escala comercial é atividade viável e tem sido bastante explorada no Brasil, seguindo os passos de outros países, como os Estados Unidos, a Holanda e a Bélgica. A qualidade das plantas obtidas de produção é superior àquela de extrações criminosas em florestas (Melo 1996), fato esse que, unido ao preço acessível, coloca as plantas cultivadas em grande vantagem no mercado. Com as atuais técnicas disponíveis, os períodos de crescimento e de floração têm sido reduzidos, aumentando ainda mais as possíveis vantagens econômicas dessa atividade (Andrade & Demattê 1999).

Segundo Andrade & Demattê (1999), em trabalho sobre a produção comercial de bromélias no Brasil, observou que a produção comercial se intensificou a partir da década de 90, e que foram localizados 27 produtores, dos quais 18 se encontram na região Sudeste e nove na região Sul. No Rio de Janeiro há um direcionamento para o cultivo de plantas de sol, usadas no paisagismo, como as plantas dos gêneros *Alcantarea*, *Neoregelia* e *Aechmea*. Essa ação é muito importante, pois suprirá o crescente mercado para paisagismo, hoje abastecido por plantas retiradas ilegalmente. Das espécies cultivadas, encontramos algumas em perigo de extinção, especialmente devido ao extrativismo, como *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith e *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, cultivada em 13 produtores e considerada planta de ciclo longo, levando, no mínimo, seis anos para chegar a ponto de comercialização.

Santos *et al.* (2005) analisaram os aspectos econômicos da cadeia produtiva das bromélias na cidade de Curitiba (PR), região metropolitana e litoral paranaense, estimando que somente no Município de Guaratuba sejam coletadas, anualmente, mais de 30 mil bromélias. A quantidade de bromélias produzidas e extraídas não atende completamente a demanda do estado, sendo necessária a compra de bromélias provenientes de outros estados, principalmente de São Paulo e Santa Catarina.

Com isso, o preço de *Alcantarea imperialis* comercializada varia muito, em Blumenau (SC) chegando ao valor de oitenta a noventa reais por unidade (Andrade & Demattê 1999), já em Curitiba e região metropolitana os valores da planta adulta vão de trinta e cinco reais para o produtor, oitenta e sete reais e cinquenta centavos no atacado e cento e vinte cinco reais no varejo (Santos *et al.* 2005).

A cadeia produtiva das bromélias ainda demanda organização dos produtores, tanto econômica quanto produtiva. A formação de cooperativas ou associações de produtores proporcionaria escala e uniformidade à produção paranaense, além de, concomitantemente, tornar-se uma ferramenta para a diminuição da extração ilegal.

Tendo em vista esses aspectos, o cultivo, além de ser economicamente mais interessante, contribui com a preservação dessas espécies.

I.2. A ESPÉCIE *Alcantarea imperialis* (CARRIÈRE) HARMS

O gênero *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms é endêmico do Brasil e compreende cerca de 22 espécies que, frequentemente, formam grandes rosetas capazes de acumular elevado volume de água. Seus espécimes ocorrem nos afloramentos rochosos (inselbergs de gneiss graníticos), nos domínios da Mata Atlântica dos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, desde o nível do mar até 1.900 metros de altitude, e em áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço, na Bahia e Minas Gerais (Versieux & Wanderley 2007a, 2007b, 2007c). O nome do gênero é uma homenagem ao segundo imperador do Brasil, Dom Pedro de Alcântara (Grant 1995b, Versieux & Wanderley 2007a). A história taxonômica de *Alcantarea* tem sido difícil e seu *status* no nível de gênero foi reconhecido por Grant (1995a, 1995b). Versieux (2009) realizou extenso trabalho sobre a sistemática, filogenia e morfologia do gênero *Alcantarea*, estabelecendo uma circunscrição mais precisa para as espécies, elucidando problemas taxonômicos do gênero, a partir de caracteres morfológicos, anatômicos e moleculares.

Segundo Bárbara *et al.* (2007), estudos recentes sobre a estrutura genética de espécies de *Alcantarea* têm revelado que a população apresenta um alto grau de isolamento, principalmente as espécies que ocorrem em inselbergs, o que pode ser a favor da especiação.

Apresentam plantas herbáceas rupícolas, vistosas, perenes, de menos de meio metro a 5 metros de altura com a inflorescência; caule curto, inconspícuo, ou robusto e coberto por restos de bainhas foliares. A roseta, em geral, infundibuliforme, forma

tanque. As folhas, em geral, são liguladas, distintamente divididas entre lâmina e bainha, com margem inteira. Com inflorescência simples ou composta; pedúnculos laterais com brácteas estéreis. Flores vistosas, dísticas ou secundas; pétalas frequentemente amarelas, raro alvacentas, efêmeras, longas, liguladas, fortemente recurvas, reflexas e espiraladas, flácidas; estames e estilete em geral exsertos; ovário semi-ínfero. Fruto cápsula septicida, ovóide, acuminada; sementes comosas no ápice e na base, os apicais desenvolvidos (Versieux & Wanderley 2007a).

Dentre as espécies de *Alcantarea*, destaca-se *A. imperialis* (Carrière) Harms (sinonímia *Vriesea imperialis* Carrière) – subfamília Tillandsioideae, conhecida popularmente como “bromélia imperial”, por ser amplamente empregada no paisagismo (Martinelli & Vaz 1988, Lorenzi & Souza 1999, Bert 2007, Versieux & Wanderley 2007b, Bobrowski *et al.* 2009).

A espécie é endêmica da Serra dos Órgãos, no Estado do Rio de Janeiro, com disjunções em locais relativamente próximos, como o Parque Estadual do Ibitipoca, em Lima Duarte, Minas Gerais (Leme 1994, Bert 2007, Versieux 2009).

O Parque Nacional da Serra dos Órgãos está localizado nas encostas atlânticas da Serra do Mar, nos Municípios de Magé, Guapimirim, Teresópolis e Petrópolis (Drummond 1997). O Parque concentra as partes mais altas da Serra do Mar, apresentando uma topografia acidentada e grandes desníveis, com altitudes que variam de 300 até 2.263 metros (Radambrasil 1983). Decorrente de sua localização na região mais alta do estado, a temperatura mínima no inverno pode atingir valores iguais ou inferiores a 0°C, no verão a temperatura média é de 24°C, resultando em uma temperatura média local de 11°C (Ibama 1989).

Planta de grande porte, heliófila, rupícola ou saxícola, geralmente formando grandes aglomerados populacionais (figura 2); caulescente, com folhas de até 150 cm de comprimento, numerosas e muito largas (20 cm), cuja textura é moderadamente rígida e

com vincos longitudinais, terminando em ápice curtamente acuminado que se torna abruptamente recurvado (figuras 3 e 4). Forma roseta funelforme, de cor verde até vermelho-escura (vinoso), obscuramente maculada próximo da base; inflorescência com dois a três metros de altura, composta, piramidal, com escapo ereto, excedendo as folhas e com brácteas escapais densamente imbricadas e recurvadas próximo do ápice (figura 4). Essa espécie floresce a partir de outubro, apresenta as maiores flores do gênero, com sépalas avermelhadas e pétalas brancas, cujo número médio de flores por inflorescência é de 505 (figuras 4 a 6) (Smith & Downs 1977, Martinelli & Vaz 1988, Leme 1994, Brown & Gilmartin 1989, Martinelli 1997, Bert 2007, Versieux 2009). A espécie apresenta antese noturna, com flores iniciando a abertura de maneira rápida, por volta de 18 horas, sendo os principais visitantes os morcegos (*Anoura caudifer* E. Geoffroy, 1818 e *Artibeus lituratus* Olfers, 1818) (Martinelli 1997).

A bromélia imperial pode reter, entre suas bainhas, vários litros de água (figura 7), chegando até 30 litros, e sua inflorescência pode atingir mais de três metros de altura (figura 4). Para atingir seu porte majestoso, entretanto, necessita de algumas décadas, às vezes até 40 anos para se tornar adulta (Carvalho 1997). 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 em ambientes florestais (Naves 2001, Bert 2007). Tal limitação de desenvolvimento pode interferir já no estabelecimento da plântula (Maun 1994).



Figuras 2-7. *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. **2.** Indivíduos em encosta na Serra dos Órgãos, Teresópolis, RJ. **3.** Vista geral da planta adulta em fase vegetativa. **4.** Aspecto da planta em floração. **5.** Detalhe da flor, indivíduo de coloração vinácea. **6.** Detalhe da flor, indivíduo de coloração verde. **7.** Detalhe do centro da roseta onde as folhas formam o tanque. Barra = 10 cm (3-7).

Pode ser cultivada isoladamente ou em grupos, em jardins (figura 8), de permeio ou não, entre pedras ou ainda em vasos individuais, sempre com terra rica em matéria orgânica. Multiplica-se por sementes e, eventualmente, pelas mudas que se formam por brotações de estolões (Lorenzi & Souza, 1999). Porém, segundo Naves (2001), apesar de produzir sementes em abundância e com alta viabilidade, não é capaz de emitir brotações laterais como a maioria das plantas dessa família.

Esta informação foi confirmada por Bárbara *et al.* (2009), em estudos sobre as relações genéticas e variações nas estratégias reprodutivas de quatro espécies de *Alcantarea*, entre elas a *A. imperialis*, que concluíram que a propagação clonal é freqüente em populações costeiras de *A. glaziouna* (Leme) J. R. Grant e *A. regina* (Vell.) Harms, mas ausente em espécies de altas altitudes, como *A. geniculata* (Wawra) J. R. Grant e *A. imperialis*. A forte estrutura genética, observada nessas espécies, constitui uma excelente base para a aplicação de marcadores genéticos para a conservação dessas bromélias importantes tanto econômica como ecologicamente.

São muitas as áreas da Mata Atlântica em que várias espécies de bromélias se encontram ameaçadas merecendo, portanto, maior atenção. Com a exploração e a destruição constante de seu maior ecossistema, a Mata Atlântica, aliada ao crescente interesse de comerciantes atraídos pelas inúmeras espécies ornamentais, as bromélias correm sério risco de desaparecimento, sendo necessário o desenvolvimento de medidas de conservação (Tardivo & Cervi 1997, Nunes 2002, Mercier & Nievola 2003). As queimadas periódicas provocadas por pessoas que consideram as bromélias responsáveis pela proliferação de mosquitos na cidade, além do fogo acidental provocado por balões ou outros objetos inflamáveis como cigarros e a eliminação da vegetação do entorno pela ocupação humana desordenada, têm contribuído, também, para a ameaça de suas espécies (Nahoum 1994, Leme 1997b).

Entre essas áreas, está a região da Serra dos Órgãos (RJ), habitat natural da bromélia imperial e cujo extrativismo local corresponde à área total de distribuição (figuras 9-10), já que seus espécimes ocorrem em grandes grupamentos populacionais (Leme 1994, Carvalho 1997, Nunes 2002). Além do extrativismo, as comunidades de bromélia imperial vêm sofrendo com os frequentes incêndios na região (figuras 11-12), principalmente devido à associação da mesma ao capim gordura (*Melinis minutiflora* P.Beauv.), o que poderá levar as bromélias ao limiar da extinção na região de Petrópolis nos próximos 40 anos, tempo suficiente para a grande parte dos exemplares adultos existentes completarem seu ciclo de vida e morrerem, sem deixar descendentes (Graeff & Pagani 1996).

Espécies consideradas com problemas críticos de conservação são aquelas restritas a uma extensão geográfica com limitada amplitude ecológica e, portanto, vulneráveis a eventos estocásticos (Mace & Hudson 1999). Essas espécies representam prioridades na conservação da biodiversidade, sendo necessário melhorar o conhecimento sobre a biologia das mesmas, especialmente nas áreas da biologia de populações, genética, ecologia e estratégias de reprodução (Falk 1990, Mace & Hudson 1999, Rodríguez-Estrella & Moreno 2006).

Conforme a lista da flora brasileira ameaçada, *Alcantarea imperialis* se enquadra na categoria “em perigo de extinção” (Biodiversitas 2007). Sendo assim, a melhor estratégia para proteção da diversidade biológica, em longo prazo, é a preservação de comunidades naturais e populações no ambiente, conhecida como preservação *in situ* ou preservação local. Porém, isso nem sempre é possível, sendo necessárias estratégias de conservação *ex situ*, onde a espécie é mantida sob supervisão e muitas vezes em condições artificiais.



Figuras 8-12. *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. **8.** Vista geral de um jardim, destacando o uso ornamental da espécie. **9.** Exemplares coletados clandestinamente e apreendidos no entorno do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, foto publicada no jornal O Diário de Teresópolis em 02 de agosto de 2007. **10.** Indivíduos retirados ilegalmente da região da Serra dos Órgãos (Carvalho 1997). **11.** População afetada por incêndio, na região da Serra dos Órgãos. **12.** Indivíduos queimados na Serra de Petrópolis (Graeff & Pagani 1996). Barra = 30 cm (8).

Os esforços de conservação *ex situ* são parte importante de uma estratégia de conservação integrada para proteger as espécies ameaçadas. Indivíduos de populações *ex situ* podem ser periodicamente introduzidos ao ambiente selvagem para aumentar os esforços de conservação *in situ*; além disso, as populações *ex situ*, que são sustentáveis, podem também reduzir a necessidade de se retirar indivíduos do ambiente selvagem (Primack & Rodrigues 2001).

A conservação *ex situ* deve ser encorajada, significando uma forma de seguro contra a extinção da espécie provocada por catástrofes, tanto de origens naturais como provocadas pelo homem. Além disso, a propagação maciça e uma ampla distribuição de plantas podem desencorajar a exploração de espécies através do comércio clandestino e ilegal (Luther 1994).

Considerando-se as bromélias, que são utilizadas por diversas espécies animais como fonte de água, alimento, abrigo ou sítio de acasalamento, fica claro seu importante papel na manutenção da biodiversidade (Oliveira *et al.* 1994, Rocha *et al.* 1997). As medidas devem abranger o estudo da biologia dessas plantas, suas populações e comunidades vegetais, de modo a possibilitar a conservação do patrimônio natural ainda existente.

Trabalhos visando a micropropagação e a conservação *ex situ* devem também ser considerados, diante de sua relevância estratégica no manejo dessas espécies e na recuperação dos diversos ecossistemas em que vivem (Carneiro & Mansur 2004, Sarasan *et al.* 2006). O desenvolvimento de técnicas de produção é indispensável para minimizar o perigo de extinção da espécie, além de atender à demanda do mercado por ornamentais e reduzir, indiretamente, a procura por exemplares provenientes do ambiente natural.

I.3. PROPAGAÇÃO DE BROMELIACEAE

I.3.1. Propagação por semente

A produção de bromélias pode ser iniciada a partir de sementes, que para germinarem podem levar de alguns dias a semanas, dependendo da espécie semeada, como *Acanthostachys pitcairnoides* (Mez) Rauh & Barthlott que leva cerca de quatro dias e *Bromelia plumieri* (E.Morren) L.B. Sm. que pode levar até 40 dias (Pereira 1988, Rouse 1992, Menescal 1994).

A forma de propagação mais utilizada por produtores de bromélias da região metropolitana de Curitiba é a partir de sementes (Santos *et al.* 2005). O sucesso da semeadura está intimamente ligado à umidade do substrato, que pode ser matéria vegetal decomposta (folhas, restos de grama, casca de árvores etc.) ou uma mistura desses materiais com areia lavada, buscando-se manter as plântulas em locais abrigados da chuva e do sol para que não sejam danificadas (Menescal 1994, Paula & Silva 2001).

Muitas espécies de bromélias requerem a presença de luz para que as sementes germinem (Downs 1964), esse controle do processo germinativo pela luz está relacionado com a adaptação das espécies a seus habitats (Mayer & Poljakoff-Mayber 1982). Mercier & Guerreiro Filho (1990), em trabalho sobre o efeito da luz e da temperatura na germinação de algumas espécies de bromélias, verificaram que as sementes são fotoblásticas positivas, não encontrando diferenças entre os regimes fotoperiódicos de 08 e 16 horas. Com relação à temperatura, os mesmos autores afirmam que a maior parte das espécies germina entre 20 e 30°C.

Conforme Mollo (2009) observou, em estudo sobre a germinação de sementes de *Alcantarea imperialis* em temperaturas de 15°C, 15/30°C (termoperíodo escuro/claro) e 30°C, o tempo de emergência das plântulas varia em função da temperatura, sendo que em 30°C ocorreu 80% da emergência em 14 dias.

Segundo Paula & Silva (2001), a falta d'água pode implicar na redução da porcentagem de germinação ou morte das plântulas recém germinadas. Por outro lado, o excesso de umidade pode provocar o aparecimento de fungos na semente, causando o mesmo efeito. Em regiões com baixa umidade relativa do ar é aconselhável cobrir a sementeira com plástico transparente, formando uma estufa. As plântulas, quando atingem cerca de 1 a 2 cm, podem ser pulverizadas com adubos foliares, utilizando-se sempre a metade da dose recomendada pelo fabricante do produto.

Os produtores menos especializados e que usam menos tecnologia optam pelo cultivo por meio de sementes colhidas de matrizes próprias, enquanto os que buscam especialização e melhores recursos tecnológicos estão procurando material de propagação mais tecnicamente elaborado, como aquele proveniente de cultivo de meristemas ou de sementes selecionadas (Andrade & Demattê 1999).

A propagação de bromélias a partir de sementes, dependendo da espécie cultivada, pode não ser capaz de fornecer um grande número de plantas em um curto espaço de tempo, sendo a uniformidade e o vigor das plantas uma característica interessante ao produtor comercial. Nesse sentido, a multiplicação *in vitro* oferece algumas vantagens, como taxas mais elevadas de obtenção de mudas com qualidade fitossanitária (Mercier & Nievola 2003). Mas, se o principal objetivo é a preservação do patrimônio genético de uma dada espécie, a micropropagação deve ser iniciada por meio da cultura *in vitro* de sementes, as quais devem ser coletadas de diferentes populações na natureza, compondo uma amostragem ampla de genótipos (Engelmann 1991, Menescal 1996, Mercier & Nievola 2003).

I.3.2. Micropropagação

A biotecnologia é uma das ferramentas na conservação das espécies ameaçadas de extinção. Dentre as técnicas utilizadas para propagação dessas espécies destaca-se o cultivo *in vitro*, tanto na germinação de sementes como na propagação clonal por explantes (Engelmann 1991, Fay 1992, 1994, Sarasan *et al.* 2006).

O cultivo *in vitro* tem muitas vantagens sobre as técnicas de propagação convencionais, como a rápida multiplicação em ambiente controlado, condições livres de patógenos, redução de espaço físico utilizado para o cultivo, entre outros (Fay 1994, Engelmann 1997, Thorpe & Harry 1997, Kozai *et al.* 1997). Também, por meio dessa técnica é possível intensificar a produção de várias espécies ornamentais (Debergh & Maene 1981, Debergh 1994, Mercier & Kerbauy 1997) em atendimento à demanda do mercado de flores e, assim, contribuir indiretamente para a redução do extrativismo como, por exemplo, das bromélias (Zornig 1996, Mercier & Nievola 2003).

Na tentativa de maximizar a diversidade genética das plantas produzidas por meio de técnicas *in vitro*, o material preferido para a iniciação de culturas é, normalmente, a semente. Dessa forma, espera-se que a integridade genética das plantas seja mantida, sem correr o risco de induzir à variação somaclonal, relacionada com a utilização de sistemas de cultura de calos e suspensão, dentre outras (Dodds 1991 *apud* Fay 1994, Mercier & Nievola 2003).

Na cultura *in vitro*, fatores como temperatura, luminosidade, água, substratos e nutrientes podem ser controlados (Debergh 1991, Kozai *et al.* 1997, Pospíšilová *et al.* 1999, Simões *et al.* 2001, Hazarika 2003, Rodrigues *et al.* 2005). Além disso, o ambiente do cultivo *in vitro* pode ser caracterizado por apresentar espaço limitado, baixa irradiação, alta umidade relativa do ar no interior dos frascos, o que pode levar a

trocas gasosas ineficientes e a um estado de saturação de CO₂ (Kozai *et al.* 1997, Pospíšilová *et al.* 1999).

Para se iniciar o cultivo *in vitro* de bromélias pode-se utilizar como explante desde sementes, ápices caulinares, gemas axiliares, fragmentos de folhas, eixos caule-raiz e plântulas produzidas *in vitro* (Carneiro & Mansur 2004).

Os primeiros trabalhos com o cultivo *in vitro* de bromélias iniciaram-se na década de 70 com Mapes (1973), que utilizou ápices caulinares de *Ananas erectifolius* L.B. Sm., *Portea petropolitana* (Wawra) Mez, *Guzmania* sp. inoculadas em meio de cultura K (Knudson 1946) e fitorreguladores. Em seguida, Jones & Murashige (1974) utilizaram ápices caulinares e gemas axilares de *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado com fitorreguladores, logo após testaram essas condições para outros 19 gêneros de Bromeliaceae.

Devido à sua importância econômica, a espécie de bromélia mais produzida por técnicas de cultivo *in vitro* é o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). O primeiro trabalho foi de Mathews & Rangan (1979), sobre os fatores hormonais na formação do calo e subsequente regeneração das plantas. Outros trabalhos foram realizados testando protocolos, principalmente a concentração de fitorreguladores e o tipo de meio de cultura, a fim de obter um grande número de plantas de alta qualidade (Mathews & Rangan 1981, Zepeda & Sagawa 1981, Pescador & Koller 1992, Kiss *et al.* 1995, Devi *et al.* 1997, Teng 1997, Guerra *et al.* 1999, Vesco *et al.* 2000, González-Olmedo *et al.* 2005, Tamaki *et al.* 2007).

Também foram descritos diversos outros sistemas de cultura *in vitro* para bromélias, tanto de espécie de interesse ornamental (Ziv *et al.* 1986, Mercier & Kerbauy 1992, Naves 2001, Santos 2009), como para endêmicas e ameaçadas (Mercier &

Kerbaudy 1994, 1995, Arrabal *et al.* 2002, Pickens *et al.* 2003, Droste *et al.* 2005, Rech Filho *et al.* 2005, Garcia-Suarez *et al.* 2006, Alves *et al.* 2006, Silva *et al.* 2007, Silveira *et al.* 2009), bem como para estudos fisiológicos, principalmente sobre a assimilação de nitrogênio (Endres & Mercier 2001, Nievola *et al.* 2001, Endres *et al.* 2002, Kurita 2008) e estudos sobre o efeito da temperatura no metabolismo (Nievola *et al.* 2005, Mollo 2009).

Tais sistemas incluem a obtenção de plantas *in vitro* a partir de: sementes (Mercier & Kerbaudy 1994, Mercier & Kerbaudy 1995, Nievola *et al.* 2005, Pickens *et al.* 2003, Droste *et al.* 2005, Garcia-Suarez *et al.* 2006, Alves *et al.* 2006, Pickens *et al.* 2006, Silva *et al.* 2007, Mollo 2009, Silva *et al.* 2009, Silveira *et al.* 2009, Chu *et al.* 2010); ápices caulinares (Davidson & Donnan 1977, Prado *et al.* 2008); gemas axilares (Mathews & Rangan 1981, Ziv *et al.* 1986, Pescador & Koller 1992, Kiss *et al.* 1995, Rech Filho *et al.* 2005) ; segmentos nodais (Nievola *et al.* 2005, Tamaki *et al.* 2007, Santos 2009); meristemas (Tombolato *et al.* 1991); folhas (Hosoki & Asahira 1980, Mercier & Kerbaudy 1992, Vinterhalter & Vinterhalter 1994).

Porém, a maioria dos estudos utiliza reguladores de crescimento, em diferentes concentrações e combinações, a fim de garantir a produção das plantas. As combinações entre o uso de reguladores e os tipos de explantes são definidas de acordo com a resposta morfogênica desejada e a disponibilidade de plantas matrizes. Portanto, o desenvolvimento de protocolos eficientes de micropropagação exige adequações para cada espécie, relativas ao tipo de explante, às combinações de reguladores de crescimento e às condições de cultura (Carneiro & Mansur 2004).

Embora tenha muitas vantagens, as técnicas de micropropagação apresentam custos elevados, se levar em conta todo o processo da multiplicação, crescimento e aclimação (Kozai 1991). Alguns fatores que aumentam o custo da produção são: o longo período requerido em cada estágio da cultura; a baixa taxa de multiplicação; a

contaminação biológica; a porcentagem de plantas mortas devido ao estresse ambiental durante a fase da aclimatação; as desordens fisiológicas e morfológicas durante a fase de multiplicação ou do crescimento; os significativos custos com a iluminação, ar condicionado e esterilização; os significativos custos com os frascos, nutrientes, reguladores de crescimento, agentes gelificantes e carboidratos; o espaço requerido para a preparação e manutenção das culturas (Kozai 1990, Zornig 1996).

I.4. CRESCIMENTO

Segundo Larcher (2006), o crescimento é o aumento permanente da quantidade de substâncias e de volume das partes vivas. As plantas crescem pela adição de módulos repetidos, como folhas, flores e ramos. Esse modo de crescimento leva à plasticidade, permitindo às plantas variarem seu padrão de crescimento em resposta à disponibilidade de luz ou outros fatores ambientais (Gurevitch *et al.* 2009).

Para que haja atividade de crescimento, é necessário que a planta tenha suas necessidades biológicas supridas. Essas necessidades se caracterizam como sendo constituídas pela interação de fatores inerentes ao sistema e de fatores externos, numa interação genótipo-ambiente (Termignoni 2005).

Porém, para se quantificar o processo de crescimento vegetal, torna-se necessária a escolha de parâmetros mensuráveis de medidas de crescimento. Esses parâmetros podem ser altura da planta, massa fresca ou massa seca, número de nós caulinares, comprimento dos internos caulinares, área foliar, diâmetro do caule, entre outros. Esses, se medidos em intervalos de tempo constante, vão apresentar a variação das medidas, dando acréscimo da matéria orgânica acumulada pela planta ao longo do tempo em que ocorre seu desenvolvimento (Hoffmann & Poorter 2002, Hunt *et al.* 2002, Benincasa, 2003, Termignoni 2005).

Sendo assim, a análise do crescimento é um método que descreve as condições morfofisiológicas da planta, em diferentes intervalos de tempo, e se propõe a acompanhar a dinâmica da produção fotossintética, avaliada através da acumulação de matéria seca. O método pode também ser usado para a investigação do efeito de fenômenos ecológicos, sobre o crescimento, como a adaptabilidade de espécies em ecossistemas diversos, efeitos de competição, diferenças genotípicas da capacidade produtiva, influência de práticas agronômicas sobre o crescimento, etc. Além desses, existem os fatores intrínsecos que afetam o crescimento e que estão associados com fenômenos fisiológicos básicos, como fotossíntese, respiração, transporte de metabólitos, metabolismo do nitrogênio, processos morfogenéticos, entre outros (Magalhães 1979).

O uso da técnica de cultivo *in vitro* possibilita o controle dos fatores ambientais, podendo alterar uma ou mais condições e dessa forma promover uma alteração no padrão de crescimento (Kozai *et al.* 1997).

Dentre os fatores que podem influenciar o crescimento das plantas podemos citar a temperatura. Nievola *et al.* (2005) verificaram uma redução do crescimento de plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr. quando cultivadas *in vitro* em termoperíodo (28°C claro/ 15°C escuro), em comparação com plantas mantidas a 28°C constante, sendo o parâmetro mais afetado o comprimento da planta, pois as plantas que se desenvolveram em temperatura constante apresentavam o dobro do comprimento se comparadas com as plantas que permaneceram em alternância de temperatura. Além disso, a mudança no regime de temperatura afetou o metabolismo fotossintético de CAM para C₃. A redução no crescimento também foi demonstrando em trabalho de Mollo (2009), sobre o efeito da temperatura no crescimento *in vitro* de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, sugerindo que a temperatura baixa teve maior influência em inibir o crescimento

das plantas do que a temperatura alta em estimular o processo, no entanto não foram observadas alterações na morfologia da espécie estudada.

Outro fator importante para o desenvolvimento das plantas é a eficiência fotossintética e, segundo Engel & Poggiani (1991), está ligada ao teor de clorofila das plantas, que pode afetar o crescimento e influenciar a adaptabilidade das mesmas aos diversos ambientes. Plantas da mesma espécie cultivadas *in vitro* apresentam, normalmente, redução nos teores de clorofila, quando comparadas àquelas plantas aclimatadas (Pospíšilová *et al.* 1999, Borghezan *et al.* 2003).

Além do crescimento, que usa dados biométricos ou de massa, a quantificação do conteúdo de clorofila e a de outros compostos nitrogenados têm sido parâmetros importantes na avaliação da nutrição nitrogenada (Argenta *et al.* 2004). No crescimento de plantas clonadas de *Ananas comosus* cultivar Smooth Cayenne, cultivadas *in vitro* em diferentes diluições dos macronutrientes do meio MS (Murashige & Skoog 1962), foi possível observar que a quantidade de clorofilas a+b não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos MS, MS/2 e MS/5, concluindo que a quantidade absorvida e assimilada de nitrogênio, a partir do meio MS/5, foi suficiente para o desenvolvimento normal dessas plantas (Tamaki *et al.* 2007).

I.5. ACLIMATAÇÃO

Outro momento crucial para o sucesso do cultivo *in vitro* é a fase da aclimatação, ou seja, quando as plantas saem das condições *in vitro* e são transferidas para as estufas (condição *ex vitro*). O índice de sobrevivência para algumas espécies, nessa fase de aclimatação, é muito baixo, tornando-se um grave problema na produção de plantas (Donnelly & Tisdall 1993, Kadleček *et al.* 2001).

Parâmetros morfofisiológicos do crescimento, como a utilização do CO₂ e produção de biomassa (Fila *et al.* 1998, Maciel *et al.* 2000, Radmann *et al.* 2001, Shim *et al.* 2003), teor de clorofila (Borghesan *et al.* 2003, Shim *et al.* 2003), características estomáticas (Barry-Etienne *et al.* 2002, Louro *et al.* 2003, Shim *et al.* 2003, Barboza *et al.* 2006), transpiração e potencial hídrico das folhas (Fila *et al.* 1998, Barry-Etienne *et al.* 2002), têm sido avaliados e relacionados à aclimação de plantas provenientes de cultura *in vitro*.

Vários parâmetros têm sido utilizados para estabelecer qual o melhor momento para a transferência das plantas cultivadas *in vitro* para a casa de vegetação. Dentre eles pode-se citar o tempo de cultivo (Skrebsky *et al.* 2004) e a massa das plantas (Barboza *et al.* 2006). Contudo, o parâmetro mais relatado é o tamanho das plantas micropropagadas, como foi observado para *Syringa vulgaris* L. (Hildebrand & Harney 1983), para *Euphorbia fulgens* Karw. (Zhang & Stoltz 1989), *Daphne odora* Thunb. (Christie & Brascamp 1989), *Saintpaulia ionantha* Wendl (Terceiro Neto *et al.* 2004).

Segundo Pierik (1987), a diminuição dos subcultivos e, conseqüentemente, no tempo de cultivo *in vitro* aumenta a economia de materiais e substâncias, sendo importante na relação custo - benefício para a produção comercial. Rodrigues *et al.* (2004), em trabalho com o desenvolvimento de mudas de *Alcantarea imperialis* em diferentes substratos, relataram que as plantas foram transferidas do cultivo *in vitro* com 7 meses de idade e 7,5 cm de altura, não fazendo menção se plantas mantidas em outros períodos no cultivo *in vitro* apresentaram sucesso na aclimação.

Adicionalmente, o desenvolvimento de raízes também foi considerado como fator importante para a aclimação de plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) (Corsato & Crocomo 2002). Esses autores concluíram que as plantas mais indicadas para a aclimação apresentavam cinco centímetros de altura, pelo menos dois pares de folhas e raízes já desenvolvidas, porém não mencionaram qual o tempo de

cultivo *in vitro* necessário para produzir plantas desse tamanho. Por outro lado, Sobrinho *et al.* (2007), em trabalho sobre a permanência no cultivo *in vitro* de plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), verificaram que quanto maior o tempo *in vitro* menor era a porcentagem de sobrevivência das plantas na aclimação. Porém, ainda não se sabe se o tempo de permanência das plantas no cultivo *in vitro* interfere no sucesso da aclimação.

I.6. ANATOMIA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS

Em vários estudos tem-se observado que as condições de cultivo *in vitro* podem levar a alterações morfológicas e interferir no processo de aclimação (Dhawan & Bhojwani 1987, Donnelly & Tisdall 1993, Majada *et al.* 2000).

Assim, a técnica de micropropagação propicia alta taxa de multiplicação, mas as plantas produzidas podem diferir em estrutura, sendo distintas fisiologicamente daquelas plantas desenvolvidas em casa de vegetação e em campo (Pospíšilová *et al.* 1999, Calvete *et al.* 2002, Hazarika 2003).

Dentre as possíveis diferenças anatômicas, entre plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação, destaca-se a alteração no desenvolvimento das células estomáticas causando má formação (Noé & Bonini 1996, Blanke & Belcher 1989, Tichá *et al.* 1999, Pospíšilová *et al.* 1999, Brutti *et al.* 2002). Outras alterações estruturais foram também encontradas nas escamas (Bandyopadhyay *et al.* 2004), cutícula (Calvete *et al.* 2002), mesofilo (Pospíšilová *et al.* 1999, Calvete *et al.* 2002). É provável que essas alterações ocorridas *in vitro* possam estar relacionadas à dificuldade de aclimação de algumas espécies. Considera-se que o funcionamento do estômato seja fator determinante para a sobrevivência das plantas no processo de aclimação, por ser a estrutura responsável

pelo controle das trocas gasosas e do suprimento hídrico dos tecidos (Pospíšilová *et al.* 1999, Hazarika 2003).

Comparações entre as folhas de mudas de *Ananas comosus*, cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação, apresentaram variações na frequência estomática, no espessamento da cutícula e parede das células epidérmicas, no formato e na sinuosidade das paredes das células do parênquima aquífero e na presença de células papilosas, demonstrando sua plasticidade fenotípica. A baixa irradiância e a alta umidade relativa do ambiente *in vitro* são fatores que, possivelmente, podem estar relacionados com a presença de células papilosas (Barboza *et al.* 2006).

Alguns estudos têm sugerido que o sucesso da aclimação das plantas oriundas de cultura *in vitro* seria dependente da quantidade de substâncias armazenadas nos tecidos da raiz e da parte aérea, o qual serviria como fonte de carbono a ser consumido no início do processo, até a emergência de novas folhas (Grout & Millan 1985, Desjardins *et al.* 1987).

Assim, informações sobre a morfologia, crescimento e fisiologia das plantas cultivadas *in vitro*, em comparação àquelas mantidas em estufa, podem contribuir no sentido de elucidar o processo de aclimação.

II. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi contribuir para conhecimento anatomofisiológico de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, visando o estabelecimento de um protocolo para a propagação de mudas a partir de sementes, que permita obter o maior índice de sobrevivência e produção de plantas dessa espécie com o menor custo e, conseqüentemente, estimular os produtores a cultivá-la para a redução de seu extrativismo e seus reflexos ambientais, principalmente os relativos à conservação da espécie e à sobrevivência de outros organismos que dela dependem.

Para tanto, diferentes protocolos foram avaliados para mudas cultivadas *in vitro* e, posteriormente, submetidas à aclimatação, comparando parâmetros morfológicos e fisiológicos destas com aqueles de mudas obtidas por meio de cultivo em estufa.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor compreensão da metodologia utilizada, todos os itens da mesma se encontram resumidos no fluxograma da figura 13.

As etapas de cultivo *in vitro*, em condições de estufa e aclimatação foram desenvolvidas no Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, e a análise estrutural foi realizada no Núcleo de Pesquisas em Anatomia, ambos do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. O experimento foi instalado em maio de 2007 e encerrado em julho de 2008.

III.1. COLETA E PREPARAÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de *Alcantarea imperialis* foram coletadas de exemplares cultivados no Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, incluídos na Coleção Viva de Bromélias do Instituto de Botânica de São Paulo.

O material testemunho se encontra depositado no Herbário do Estado “Maria Eneyda P.K. Fidalgo” (sigla SP), coleta de L.M. Versieux n.º. 450.

Após a coleta, as sementes foram separadas manualmente dos frutos (figura 14) e ficaram acondicionadas em envelopes de papel pardo, mantidas a 10 °C até a realização dos experimentos (cerca de 6 meses) na sala de cultura do Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais.

Para utilização nos experimentos, os apêndices plumosos foram retirados manualmente das sementes (figuras 15-16), que foram, então, submetidas à desinfestação superficial segundo Kurita (2008), com etanol 70% por 5 minutos, seguida por uma imersão em solução de benomil 1% (Benlat®) por 5 minutos, transferidas para solução de hipoclorito de sódio comercial 4% (v/v) adicionada de algumas gotas de Tween 20, onde foram mantidas durante 60 minutos.

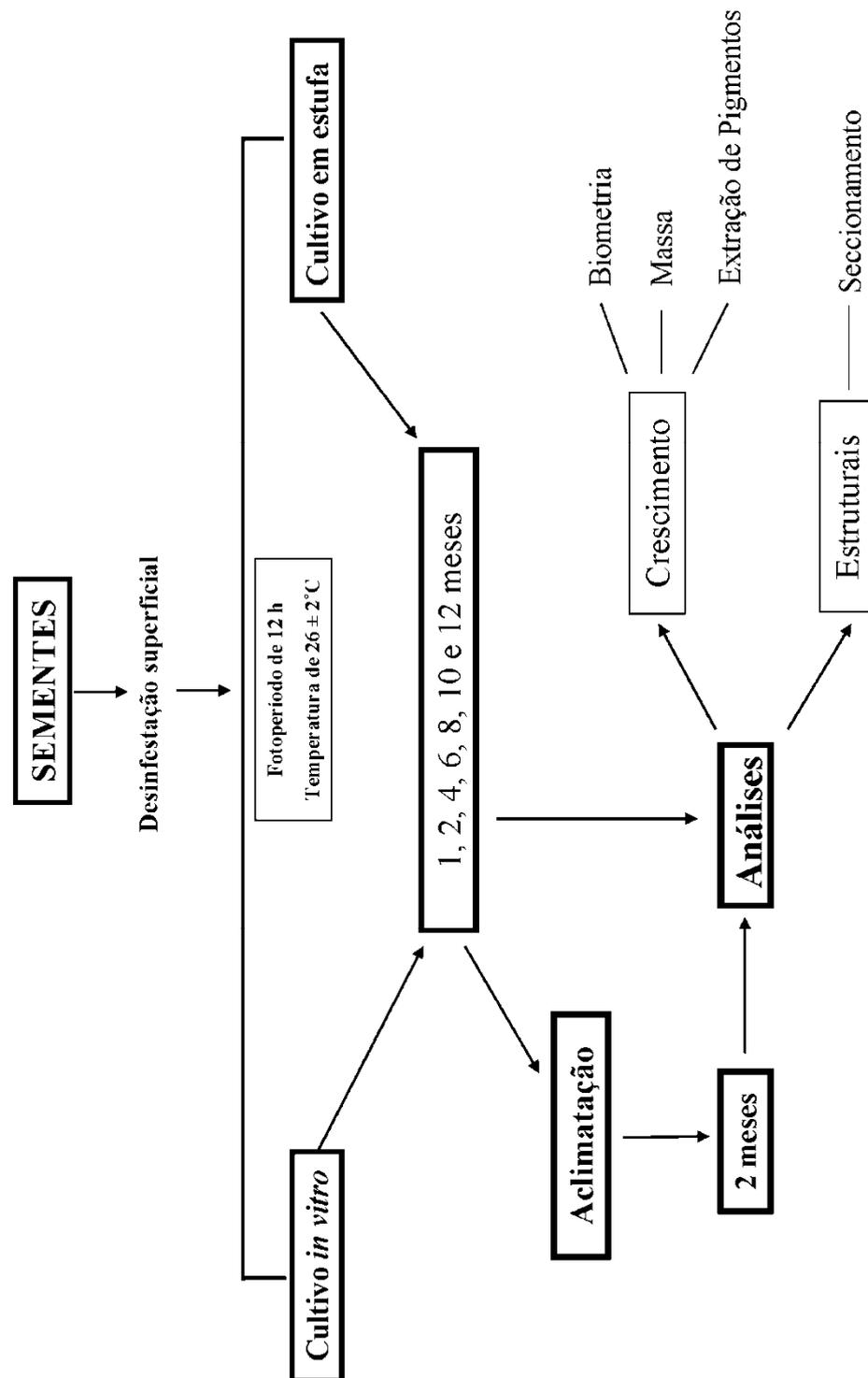
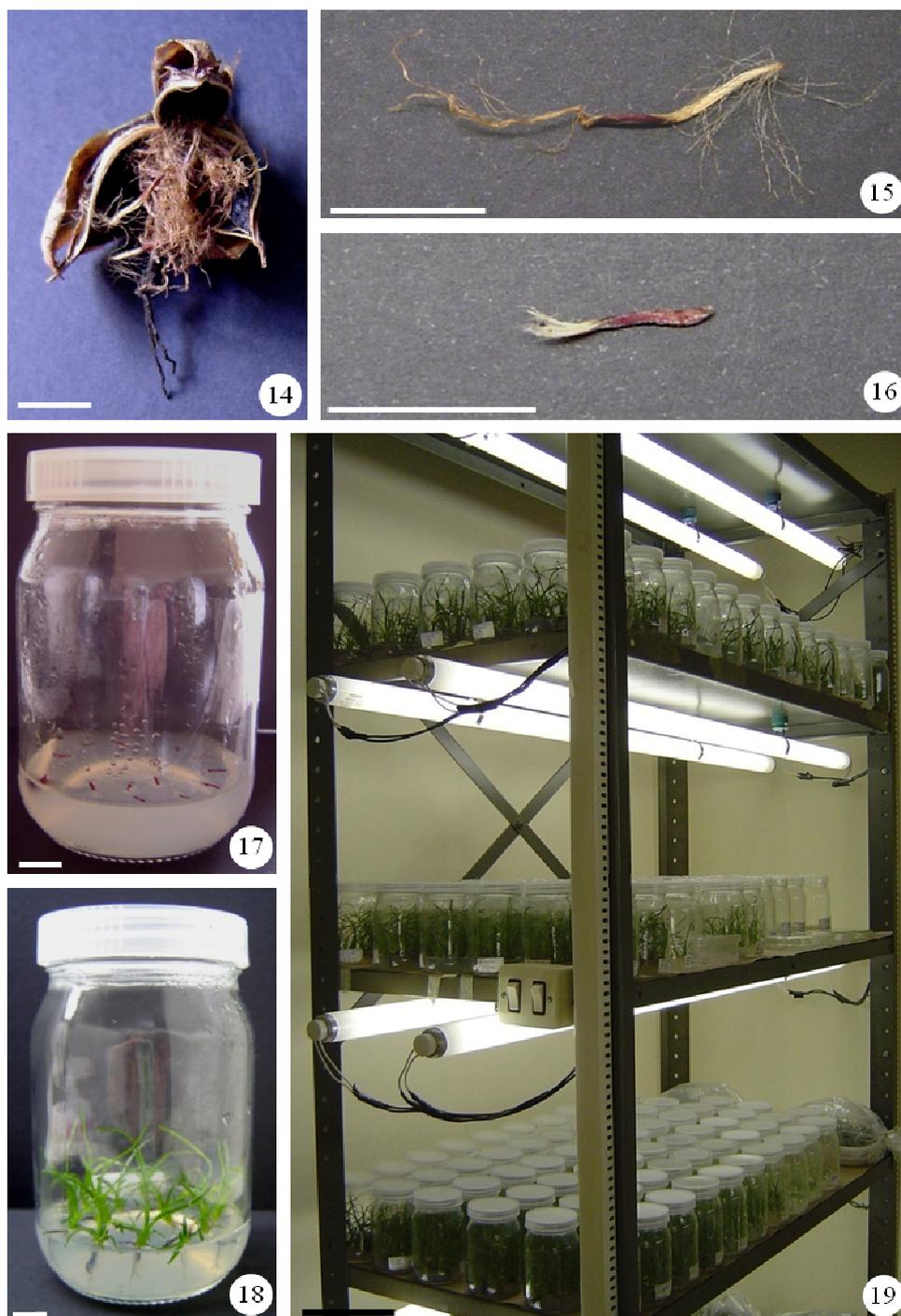


Figura 13. Fluxograma das etapas de estabelecimento das plantas *in vitro*, estufa e aclimatadas.



Figuras 14-19. Montagem do experimento *in vitro* com sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. **14.** Fruto seco aberto com sementes expostas. **15.** Semente com apêndices plumosos. **16.** Semente sem apêndices plumosos. **17.** Frasco de cultivo *in vitro* com sementes. **18.** Frasco de cultivo *in vitro* com plantas jovens. **19.** Estante com o experimento na sala de crescimento. Barra = 1 cm (14-18); 10 cm (19).

Todo o procedimento de desinfestação foi realizado sob agitação manual. Após essa etapa, o procedimento ocorreu dentro da câmara de fluxo laminar, sendo as sementes enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada e, em seguida, depositadas em meio de cultura ou em gerbox sob papel de filtro umedecido com água destilada.

III.2. EFEITO DA LUZ NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES

O experimento foi conduzido com delineamento experimental inteiramente casualizado, envolvendo três tratamentos: fotoperíodos de 12 e 16 horas, com irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ obtida pelo radiômetro LI-COR model LI-189, e escuro contínuo, tanto nas condições de cultivo *in vitro* como em gerbox com papel de filtro. Cada tratamento teve quatro repetições com 50 sementes cada.

Após desinfestação superficial, as sementes foram colocadas em gerbox sobre papel de filtro umedecido com água destilada. Para o tratamento no escuro as sementes foram depositadas em gerbox preto. Todas as sementes dos diferentes tratamentos receberam água periodicamente.

O lote cultivado *in vitro* utilizou o meio de cultura básico de Murashige & Skoog (1962), contendo metade da concentração original dos macronutrientes e a concentração original dos micronutrientes, representado por MS/2 (Tamaki *et al.* 2006). Ao meio foram adicionados 100 mg L^{-1} de mio-inositol, $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ de tiamina, 5 g L^{-1} de ágar e 30 g L^{-1} de sacarose. Em placas de Petri com 10 cm de diâmetro foram adicionados 10 mL de meio de cultura. Em capela de fluxo laminar de ar estéril foram depositadas 50 sementes por placa de Petri. Para o tratamento no escuro as placas foram acondicionadas no interior de gerbox preto. Tanto as placas de Petri como os gerbox foram mantidos em temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 15 dias, foram avaliados a germinabilidade (porcentagem de germinação) e tempo médio de germinação.

III.3. ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL

Para o acompanhamento do desenvolvimento pós-seminal foram montados lotes de sementes em cultivo *in vitro* e em condições de estufa, utilizando-se sementes que, após a desinfestação superficial, foram colocadas em caixa gerbox sobre papel de filtro umedecido com água destilada, sendo mantidas nas mesmas condições de luminosidade e temperatura.

O lote cultivado *in vitro* utilizou o meio de cultura básico de Murashige & Skoog (1962), contendo metade da concentração original dos macronutrientes e a concentração original dos micronutrientes, representado por MS/2 (Tamaki *et al.* 2006). Ao meio foram adicionados 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,1 mL L⁻¹ de tiamina, 5 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose. Em placas de Petri com 10 cm de diâmetro foram adicionados 10 mL de meio de cultura. Em capela de fluxo laminar de ar estéril foram depositadas 50 sementes por placa de Petri. As placas de Petri foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, irradiância de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 \pm 2°C.

As coletas foram diárias até 30 dias nas duas condições de cultivo. A descrição morfológica do desenvolvimento pós-seminal até a formação de uma planta seguiu a metodologia proposta por Pereira (1988) para espécies de Bromelioideae e de Tillich (2007) para Poales, as etapas do desenvolvimento foram apresentadas segundo tabela adaptada de Stewart *et al.* (2003).

III.4. COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO E ANATOMIA DAS PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO*, EM ESTUFA E ACLIMATADAS

III.4.1. Estabelecimento do cultivo *in vitro* a partir de semente

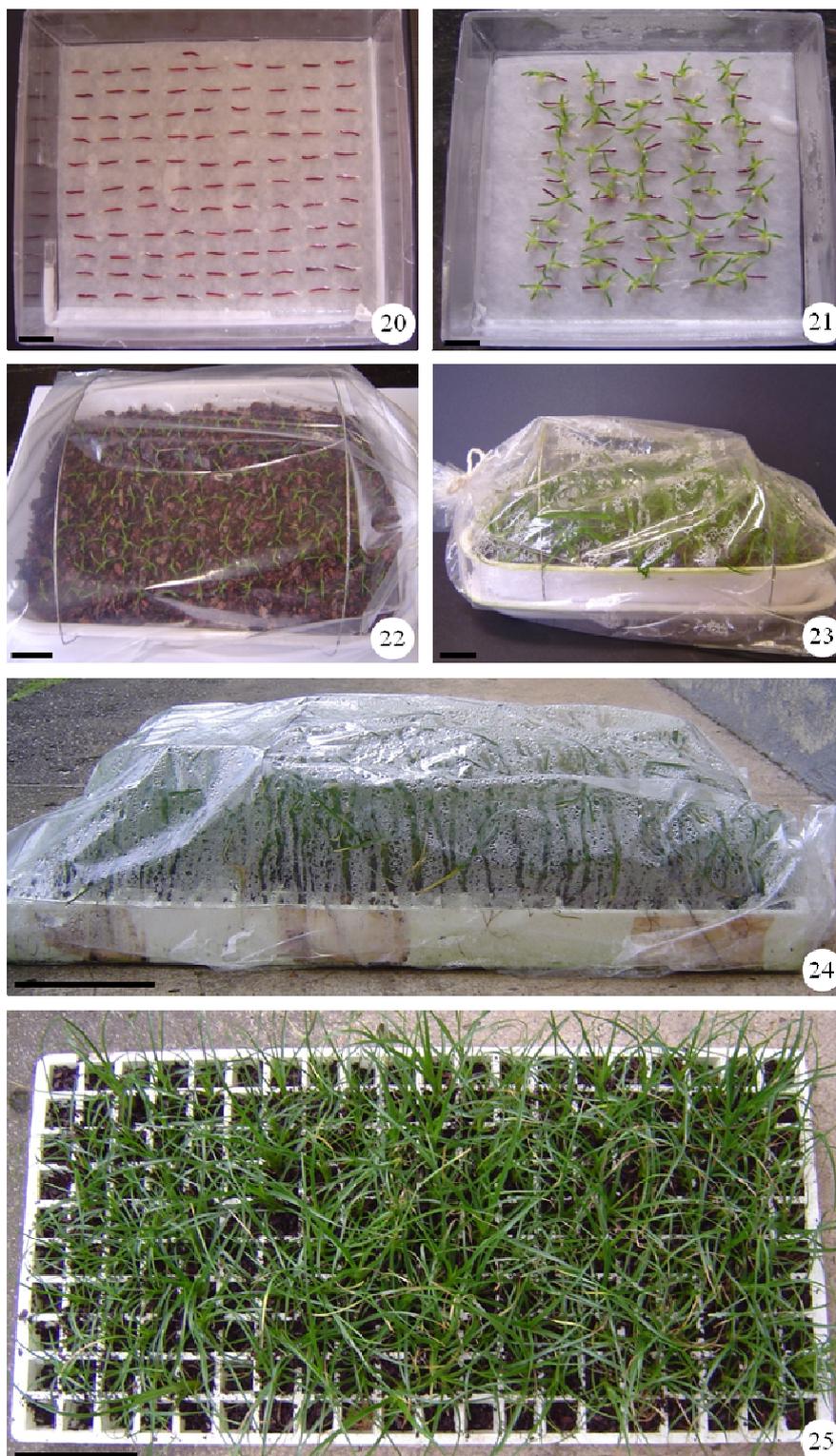
O meio de cultura básico foi o de Murashige & Skoog (1962), contendo metade da concentração original dos macronutrientes e a concentração original dos

micronutrientes, representado por MS/2 (Tamaki *et al.* 2006). Ao meio foram adicionados 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,1 mL L⁻¹ de tiamina, 5 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose.

Em frascos com 250 mL de capacidade foram adicionados 40 mL do meio. Em capela de fluxo laminar de ar estéril foram depositadas 15 sementes por frasco de cultura (figura 16). Os frascos de cultura foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, irradiância de 30 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ (figura 13,18-19). As plantas do cultivo *in vitro* foram transferidas a cada 4 meses para meio de cultura novo, a fim de que não ocorresse deficiência nutricional.

III.4.2. Estabelecimento do cultivo em estufa a partir de semente

Utilizaram-se 20 caixas gerbox revestidas por papel de filtro umedecido com água destilada, nas quais foram depositadas 100 sementes por caixa, totalizando 2000 sementes (figuras 13, 20 e 21). Após um mês, as plantas obtidas foram transferidas para bandejas de isopor de 21,5 x 14,5 x 4 cm preenchidas com substrato de casca de *Pinus* moída previamente embebida em água, o espaçamento entre as plantas foi de 3 cm (figuras 22-23). Após 4 meses de cultivo, as plantas foram transferidas para bandejas de isopor com 200 células, colocando-se uma planta por célula (De Paula *et al.* 2006). As caixas gerbox e as bandejas de isopor foram mantidas na sala de crescimento, juntamente com as culturas *in vitro*. As bandejas foram adubadas mensalmente com solução contendo as mesmas quantidades de macronutrientes, micronutrientes, mio-inositol e tiamina do meio de cultura MS/2, não foi acrescentada a solução o ágar e a sacarose. Para evitar a perda excessiva de umidade, as bandejas foram envolvidas por saco plástico transparente, a irradiância apresentou valores similares com ou sem a barreira plástica, ou seja cerca de 30 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ (figuras 22-23).



Figuras 20-25. Montagem do experimento em condições de estufa com sementes de *Alcantarea imperialis*. **20.** Gerbox com sementes. **21.** Gerbox com plântulas (1 mês). **22.** Bandeja com plântulas em substrato de casca de *Pinus* envolvida por saco plástico (1 mês). **23.** Bandeja com plantas do lote cultivado em estufa envolvida por saco plástico (2 meses). **24.** Bandeja com plantas do lote de aclimatação envolvida por saco plástico (8 meses). **25.** Bandeja com plantas após o período de aclimatação (10 meses). Barra = 2 cm (20-23); 10 cm (24-25).

III.4.3. Aclimação: estabelecimento do período “*in vitro*” adequado

No estudo de aclimação, 100 plantas cultivadas *in vitro* foram transferidas para condições *ex vitro* após 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Para tanto, foram colocadas em bandejas de isopor com 200 células com substrato de casca de *Pinus* moída previamente embebida em água, onde permaneceram por 2 meses (figuras 13, 24-25). As bandejas foram adubadas mensalmente com solução nutritiva (MS/2), igual àquela utilizada para as plantas cultivadas em estufa. Para evitar a perda excessiva de umidade, as bandejas foram envolvidas por saco plástico transparente e permaneceram em sala de crescimento nas mesmas condições de temperatura e luminosidade das plantas cultivadas *in vitro* e em estufa.

Dessa forma, foram estabelecidos os tratamentos, segundo a tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos de aclimação de plantas de *Alcantarea imperialis*.

Tratamento	Período de cultivo	
	<i>In vitro</i>	Estufa (aclimação)
I	1 mês	2 meses
II	2 meses	2 meses
III	4 meses	2 meses
IV	6 meses	2 meses
V	8 meses	2 meses
VI	10 meses	2 meses
VII	12 meses	2 meses

III.5. COLETA

As plantas cultivadas *in vitro* e cultivadas em estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses foram submetidas às análises de acúmulo de massa fresca e seca, análises biométricas de número e comprimento das raízes e folhas, teor de clorofila e de carotenóides. As plantas aclimatadas foram coletadas 2 meses após a transferência (tratamentos I a VII) e analisadas quanto aos mesmos parâmetros (figura 13).

III.6. PARÂMETROS AVALIADOS

III.6.1. Análise biométrica

Nas análises biométricas foram avaliadas 50 plantas, coletadas ao acaso de cada tratamento (dentre as cultivadas *in vitro*, em estufa e aclimatadas), quanto ao número de raízes e folhas e, também, quanto ao comprimento da raiz mais longa e da folha mais longa com o auxílio de régua milimétrica.

III.6.2. Determinação de massa

Retiraram-se, ao acaso, de 3 a 150 plantas provenientes de cultivo *in vitro*, cultivo em estufa e plantas aclimatadas. O número de plantas variou de acordo com a dimensão das mesmas, uma vez que utilizou-se o mínimo 0,1g de massa fresca para cada amostra. As plantas foram separadas em duas partes, a aérea e a das raízes, utilizando-se três amostras compostas para cada coleta. As medidas de massa seca foram realizadas após secagem em estufa a 60°C, até massa constante (cerca de 72 horas) em balança analítica de precisão.

III.6.3. Determinação do teor de clorofila e de carotenóides

Amostras compostas de cada coleta com no mínimo 0,3 g de folhas frescas foram congeladas para a determinação de clorofilas e de carotenóides, segundo técnica descrita por Lichtenthaler (1987), utilizando-se três amostras para cada coleta. A extração dos pigmentos foi realizada sob baixa luminosidade para impedir sua degradação pela luz. O material congelado a temperatura de -20°C foi macerado com acetona P.A. e em seguida filtrado papel de filtro. A solução resultante foi transferida para cubetas e as leituras foram realizadas, sob penumbra, em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 710 nm (resíduos), 661,6 nm (clorofila *a*), 644,8 nm (clorofila

b) e 470 nm (carotenóides). O conteúdo de cada pigmento foi calculado pelas equações apresentadas por Lichtenthaler (1987):

$$Cl\ a = [(11,24\ A_{661,6}) - (2,04\ A_{644,8})] (V\ M^{-1})$$

$$Cl\ b = [(20,13\ A_{644,8}) - (4,19\ A_{661,6})] (V\ M^{-1})$$

$$Cl\ a + b = (7,05\ A_{661,6}) + (18,09\ A_{644,8})$$

$$Cl\ a\ b^{-1} = C_a\ C_b^{-1}$$

$$\text{Carotenóides} = [(1000\ A_{470}) - (1,90\ C_a) - (63,14\ C_b)]\ 214^{-1}$$

Onde:

A é a absorbância, **V** é o volume da amostra (mL), **M** é a massa fresca da amostra (mg),

$Cl\ a$ é o valor de clorofila *a* e $Cl\ b$ é o valor de clorofila *b*.

Os conteúdos de clorofilas e carotenóides dos tecidos foram expressos em μg do pigmento por grama de massa fresca.

III.6.4. Índice de Suculência da parte aérea

Segundo Kluge & Ting (1978) o índice de suculência pode ser calculado com base na equação:

$$\text{Índice de Suculência (mg } \mu\text{g}^{-1}) = (\text{massa fresca} - \text{massa seca}) (\text{teor de clorofila a} + \text{b})^{-1}$$

III.6.5. Análise de Desenvolvimento

A partir dos dados primários (massa fresca e massa seca), parâmetros subseqüentes foram determinados, tais como:

$$\text{Razão raiz : parte aérea} = (\text{massa seca da raiz}) (\text{massa seca da parte aérea})^{-1}$$

$$\text{Razão número de folhas mortas : número total de folhas} =$$

$$(\text{número de folhas mortas}) (\text{número total de folhas})^{-1}$$

$$\text{Razão de peso de folha} = (\text{massa seca da parte aérea}) (\text{massa seca total da planta})^{-1}$$

$$\text{Distribuição de biomassa (raízes e parte aérea)} =$$

$$(\text{massa seca do órgão}) (\text{massa seca total da planta})^{-1} 100$$

- Taxa de Crescimento

A taxa de crescimento relativo (TCR) é a variação ou incremento em massa, altura, número de folhas, área foliar ou qualquer outro parâmetro de avaliação de crescimento, ao longo de um determinado período, estando diretamente relacionado ao valor alcançado no período anterior (Benincasa, 2003). Dessa forma, foram utilizados para cálculos de taxa de crescimento relativo das plantas cultivadas *in vitro*, em condições de estufa e aclimatadas os dados de média de massa fresca e seca, tanto das raízes como da parte aérea.

As taxas de crescimento relativo (TCR) foram calculadas segundo a equação:

$$TCR = [(LnP_2 - LnP_1)] (t_2 - t_1)^{-1}$$

Onde:

Ln é o logaritmo natural, *P*₂ é o valor atual do parâmetro, *P*₁ é o valor anterior do parâmetro e *t* é o tempo (índice ₁ = valor inicial e índice ₂ = valor final).

III.6.6. Análise estrutural

III.6.6.1. Anatomia foliar de plantas adultas

Buscando um maior entendimento sobre a anatomia da espécie estudada, realizou-se um estudo sobre a anatomia foliar da espécie adulta, ainda não descrita na literatura.

Foram utilizadas folhas adultas, expandidas, retiradas da periferia da roseta foliar de indivíduos provenientes do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo, cujo material testemunho da planta mãe se encontra depositado no Herbário do Estado “Maria Eneyda P.K. Fidalgo” (sigla SP), coleta de L.M. Versieux n^o. 450.

Amostras da porção mediana da folha foram fixadas em FAA (formaldeído:ácido acético:álcool etílico 50%, 2:1:18, v/v), de acordo com Johansen (1940), mantidas por 48 horas e posteriormente transferidas para etanol 70%.

As folhas foram seccionadas transversalmente, à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear e isopor.

As secções foram clarificadas com solução de hipoclorito de sódio a 10%, coradas com azul de astra 1% e safranina 1% (Bukatsch 1972), desidratadas pela série etílica e montadas entre lâmina e lamínula com resina Permout®.

As lâminas foram analisadas ao microscópio fotônico e as ilustrações obtidas em fotomicroscópio, com projeção de escalas micrométricas.

Para análise da micromorfologia das superfícies foliares, as amostras retiradas da região da bainha foram coletas e imediatamente distentidas entre lâminas de vidro para a secagem em estufa à temperatura de 40 °C. Porções foliares, secas, foram fixadas em suportes de alumínio e metalizadas com ouro para análise ao microscópio eletrônico de varredura. As características estruturais foram mostradas por meio de elétronicografias.

III.6.6.2. Anatomia foliar de plantas cultivadas *in vitro* e em condições de estufa

A estrutura foliar de plantas cultivadas *in vitro* e em condições de estufa foi comparada utilizando-se plantas com 4, 6 e 12 meses de idade em cada uma das condições de cultivo. As plantas cultivadas *in vitro* e em condições de estufa foram lavadas em água corrente, as provenientes do cultivo *in vitro* para retirada do meio de cultura e as do cultivo em estufa tiveram suas raízes lavadas para a remoção do substrato. Os estudos foram realizados em cinco plantas de cada condição de cultivo, utilizando-se a terceira ou quarta folha a partir do ápice.

As amostras para os estudos anatômicos foram, inicialmente, fixadas em solução aquosa 50% de FAA (formaldeído:ácido acético:álcool etílico 50%, 2:1:18, v/v), de acordo com Johansen (1940), permanecendo 24 horas nessa solução e, posteriormente, mais 24 horas em solução concentrada do mesmo FAA, sendo em seguida transferidas para etanol 70%.

Pequenas amostras da porção mediana do limbo foram submetidas à desidratação em série etílica até etanol 95%, posteriormente pré-infiltradas com solução de etanol 95% e incluídas em metacrilatoglicol (historresina Leica), seguindo as instruções do fabricante e a técnica de Feder & O'Brien (1968). O material incluído foi seccionado em micrótomo rotativo. As secções transversais obtidas (7 μ m de espessura) foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato 0,1M pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1965, modificado).

As características estruturais foram documentadas por meio de ilustrações, obtidas com o auxílio de estereomicroscópio equipado com câmara clara, ou por meio de fotomicrografias.

III.7. ANÁLISE DE DADOS

Para a análise dos dados foi utilizada a estatística descritiva, calculando-se o desvio padrão entre as médias obtidas. Os dados de biometria (número e comprimento das raízes, número de folhas sadias e mortas e comprimento das folhas) e de massa, tanto fresca como seca, foram submetidos ao teste de normalidade, à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey, utilizando-se o pacote estatístico BioEstat 5.0. Com exceção dos dados biométricos e de massa, os demais são índices fisiológicos, que por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância.

IV. RESULTADOS

IV.1. EFEITO DA LUZ NA GERMINAÇÃO (tabela 2)

Com relação ao fotoperiódico, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com 12 horas e 16 horas (tabela 2), e entre as duas condições de cultivo (papel de filtro e meio de cultura).

Tabela 2. Porcentagem de germinação de sementes de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em papel de filtro submetidas a diferentes fotoperíodos e a escuro contínuo.

PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO(%)			
(X ± S)			
Tipo de cultivo	Fotoperíodo		Escuro
	12 horas	16 horas	
<i>In vitro</i>	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	0 ± 0 bB
Papel de filtro	92,5 ± 2,52 aA	93,5 ± 3,42 aA	0 ± 0 bB

*Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical
Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Todavia, foi possível verificar que as sementes dessa espécie são fotoblásticas positivas, pois não germinaram na condição de ausência de luz, independente do tipo de cultivo utilizado, apresentando o tempo médio de germinação de quatro dias.

IV.2. DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL (figuras 26 a 29; tabela 3)

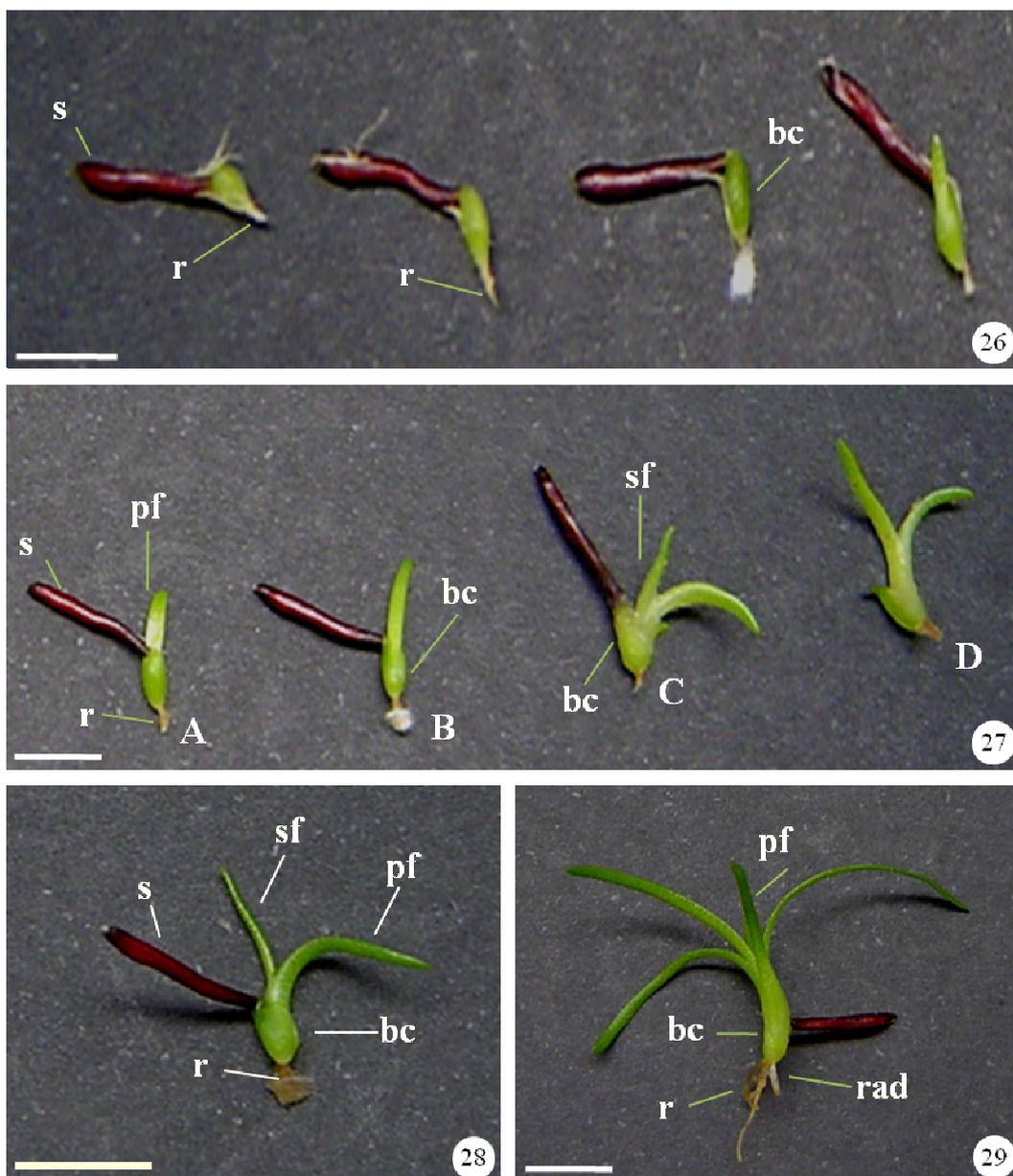
Em *Alcantarea imperialis* o tipo de germinação é epígea, com a plântula do tipo criptocotiledonar com cotilédone de reserva.

As plântulas normais observadas se caracterizavam por possuírem raiz principal curta e cônica (figuras 26 e 27), raízes adventícias surgindo a partir do colo (figura 28), bainha cotiledonar verde e carnosa (figura 28). A primeira folha é plana, lanceolada, de bordos inteiros e superpostos na base, formando a roseta (figuras 27 e 28).

Não foram observadas diferenças morfológicas entre as plântulas desenvolvidas no cultivo *in vitro* quando comparadas com as plântulas provenientes do cultivo em estufa.

O que se pode observar é um desenvolvimento mais rápido nas plântulas das condições *in vitro* de aproximadamente 2 dias, notadamente a partir do aparecimento da primeira folha, por volta dos 10 dias; fato semelhante ocorre quando do aparecimento da segunda folha (tabela 3).

Nas plântulas desenvolvidas no cultivo *in vitro*, as raízes adventícias também tiveram predominância de aparecimento em relação às plântulas com mesma idade cultivadas em gerbox (tabela 3).



Figuras 26-29. Etapas do desenvolvimento pós-seminal de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. **26.** Plântulas com 10 a 15 dias. **27.** Plântulas com 15 a 25 dias. **27A.** 15 dias. **27B.** 18 dias. **27C.** 20 dias. **27D.** 25 dias. **28.** Plântula com 20 dias. **29.** Planta com 40 dias. (bc: bainha cotiledonar; pf: primeira folha; r: raiz principal; rad: raiz adventícia; s: semente; sf: segunda folha). Barra = 0,5 cm (26-29).

Tabela 3. Etapas do desenvolvimento pós-seminal de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em gerbox por 20 dias.

Etapa	Descrição do desenvolvimento pós-seminal	Tempo (dias)	<i>In vitro</i>	Gerbox
1	Semente embebida e dilatada	1	100%	100%
2	Semente inchada com o tegumento partido	2	100%	100%
3	Início da protusão da raiz (= 1mm)	3	95%	94%
4	Aparecimento da bainha cotiledonar	8	78%	62%
5	Início da primeira folha	10	32%	0
6	Primeira folha expandida	13	56%	4%
7	Aparecimento da segunda folha	15	15%	0
8	Aparecimento das raízes adventícias	20	30%	1%

IV.3. COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO E ANATOMIA DAS PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO* E EM CONDIÇÕES DE ESTUFA (figuras 30 a 88; tabelas 4 a 8)

A análise dos dados biométricos das raízes (figuras 30A,B) mostrou que as plantas cultivadas *in vitro* apresentaram maiores valores tanto para o número de raízes como para o comprimento, sendo as plantas do cultivo *in vitro* com 12 meses de idade as que apresentaram as maiores diferenças significativas quando comparadas com as plantas de mesma idade cultivadas em condições de estufa. O número de raízes (figura 30A) nas plantas cultivadas *in vitro* sofreu um aumento mais expressivo a partir do 6º mês de cultivo, sendo que as plantas do cultivo *in vitro* apresentaram o dobro do

número de raízes das plantas com a mesma idade e cultivadas em condições de estufa. Nas plantas com 12 meses *in vitro* o número foi 3 vezes o das plantas com a mesma idade cultivada em condições de estufa.

Com relação ao comprimento das raízes (figura 30B), os valores também mostraram um aumento relevante nas plantas cultivadas *in vitro* quando comparadas com aquelas em condições de estufa, sendo mais evidente a partir do 6º mês. Nas plantas com 12 meses de cultivo *in vitro* o aumento no comprimento das raízes foi quatro vezes maior quando comparadas com as plantas de mesma idade mantidas em condições de estufa.

Os dados de massa para as raízes, tanto fresca como seca (figuras 30C,D), apresentaram aumento em todos os períodos analisados. As plantas do cultivo em estufa apresentaram valores menores de massa fresca das raízes (figura 30C) quando comparadas com as plantas do cultivo *in vitro*, sendo essa diferença mais evidente a partir do 6º mês. Os dados de massa seca das raízes das plantas do cultivo em estufa (figura 30D) só foram maiores nas plantas com 1 mês de idade, nos demais períodos as plantas do cultivo *in vitro* apresentaram valores maiores de massa seca das raízes.

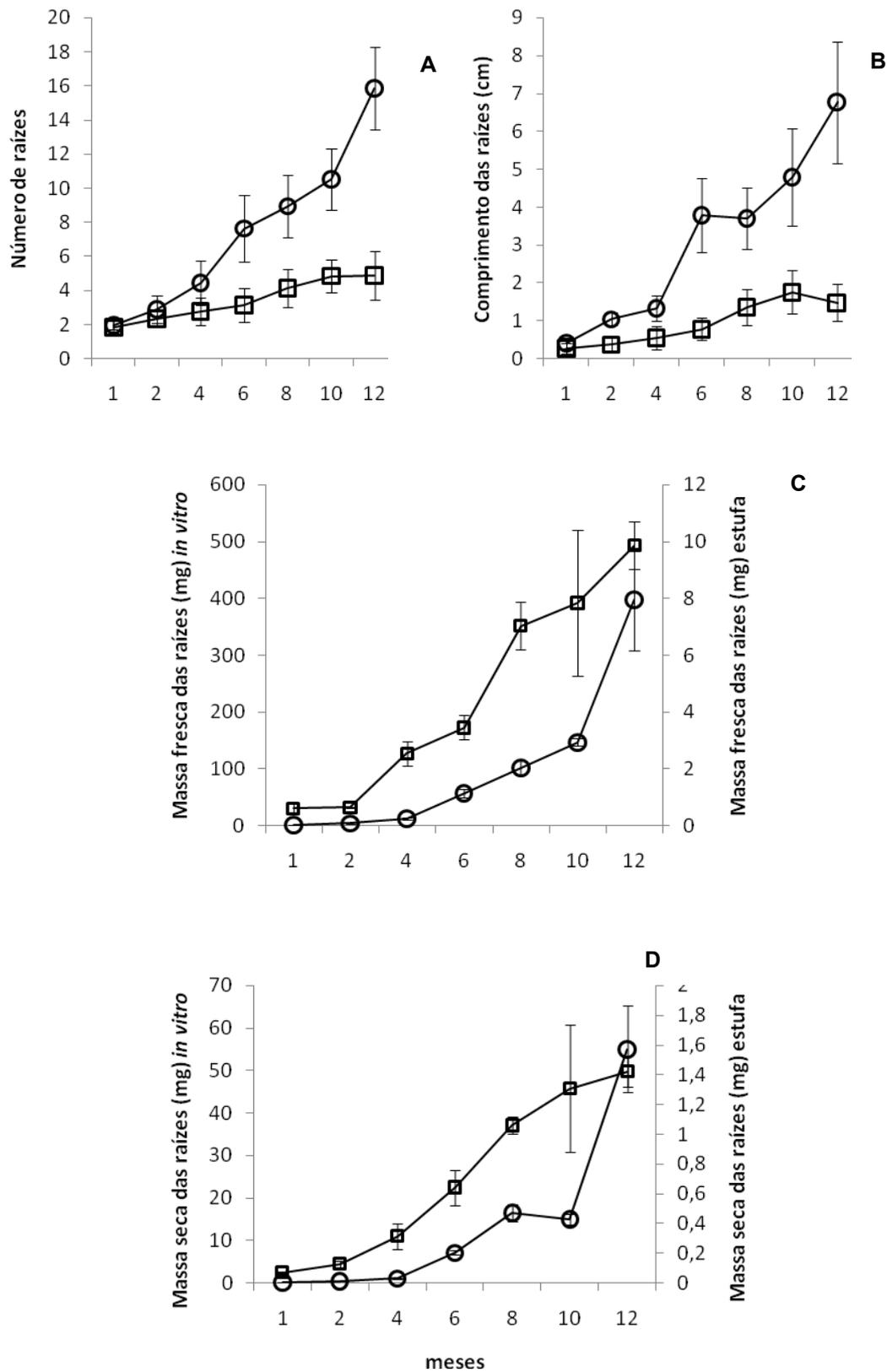


Figura 30. Crescimento de raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* (○) e em condições de estufa (□) por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. **A.** Número. **B.** Comprimento (cm). **C.** Massa fresca (mg). **D.** Massa seca (mg). Os valores representam a média de 50 plantas e as barras indicam o desvio padrão.

Em relação à parte aérea, os valores de número de folhas saudias (figura 31A) foram próximos em todos os períodos analisados, com exceção dos 6 meses de cultivo *in vitro*, que apresentou mais folhas saudias quando comparado com as plantas de mesma idade cultivadas em condições de estufa. Porém, após esse período, os valores ficam semelhantes e as plantas cultivadas por 12 meses em estufa apresentam cerca de 12 folhas saudias. Para o número de folhas mortas (figura 31B), nas plantas do cultivo *in vitro* só começam a ocorrer a partir do 6º mês, e para as plantas cultivadas em condições de estufa no 2º mês. Embora na condição de cultivo em estufa as folhas morram mais cedo, no cultivo *in vitro* a quantidade foi maior, chegando ao dobro dos valores aos 10 meses de cultivo e o triplo com 12 meses.

Quanto ao comprimento das folhas (figura 31C), as plantas apresentaram aumento nos valores em todos os períodos estudados, porém nas plantas com 6 meses de cultivo *in vitro* o comprimento das folhas foi o dobro, quando comparada com as de mesma idade cultivadas em condições de estufa.

Os dados de massa da parte aérea, tanto fresca como seca, apresentaram aumento em todos os períodos analisados. Os dados de massas fresca e seca (figura 32A,B) apresentaram as maiores diferenças entre os valores nos períodos de cultivo *in vitro* a partir de 6 meses, quando comparados com as plantas de mesma idade cultivadas em condições de estufa.

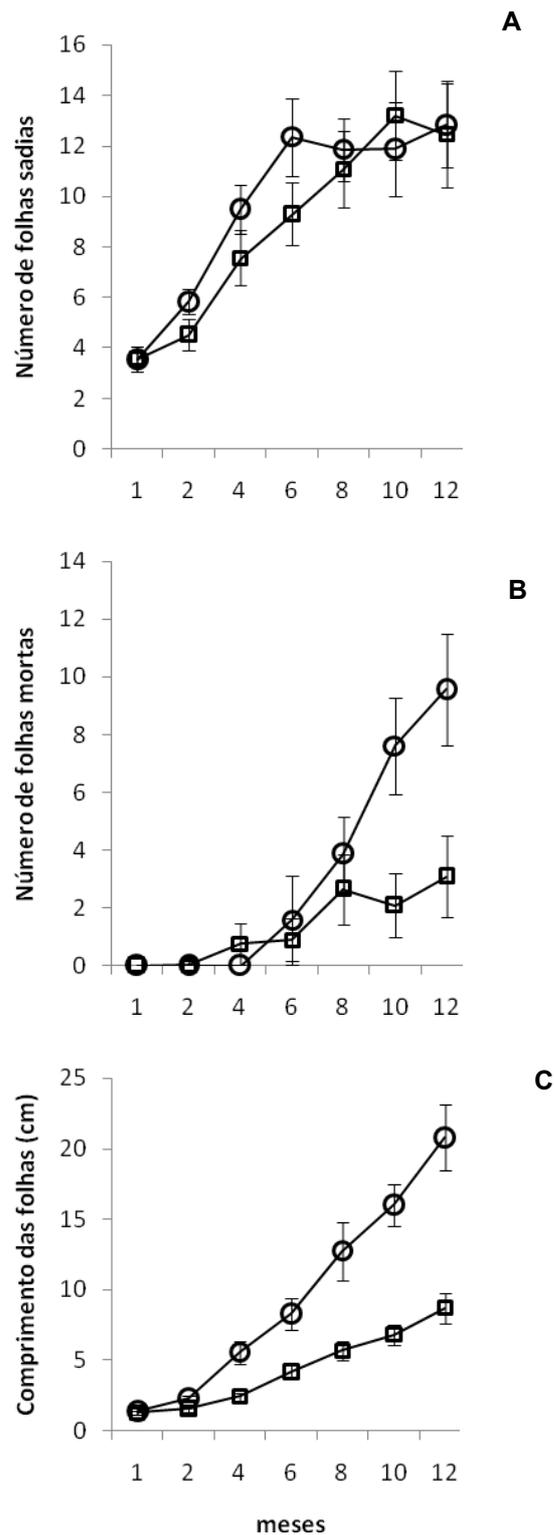


Figura 31. Crescimento da parte aérea de plantas de *Alcantarea imperialis*(Carrière) Harms cultivadas *in vitro* (○) e em condições de estufa (□) por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. **A.** Números de folhas saudáveis. **B.** Números de folhas mortas. **C.** Comprimento das folhas (cm). Os valores representam a média de 50 plantas e as barras indicam o desvio padrão.

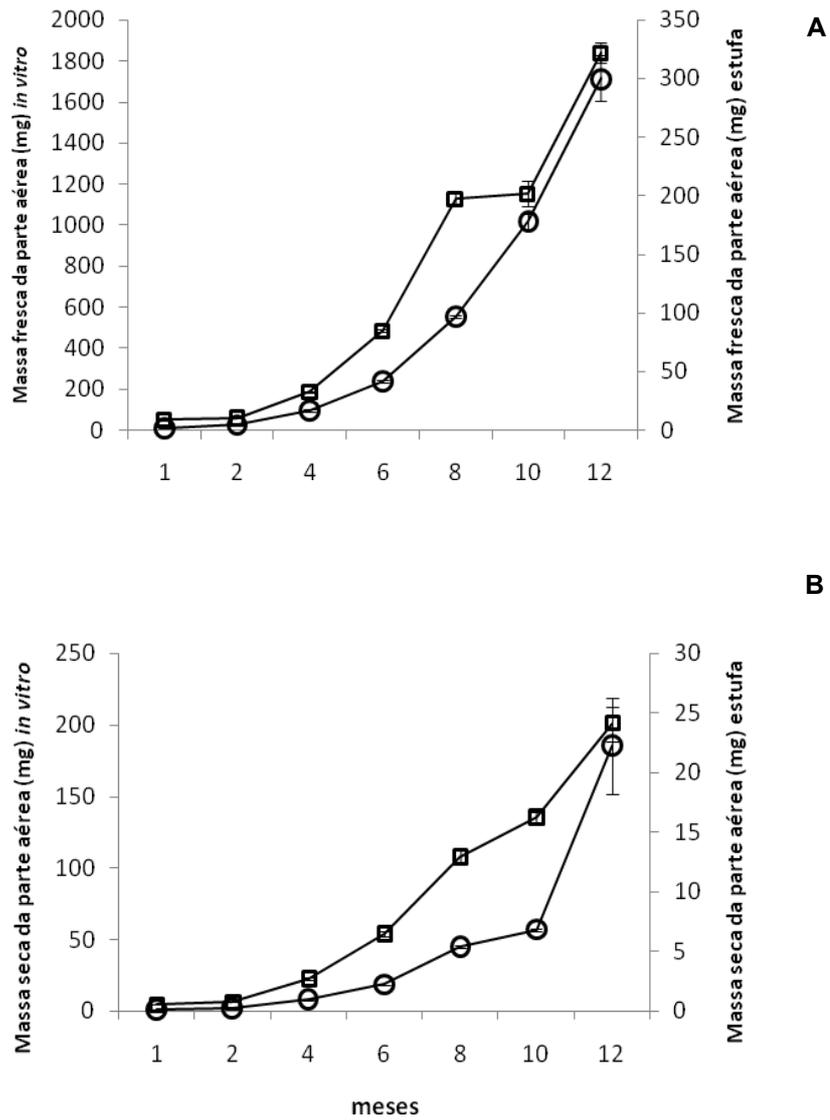


Figura 32. Crescimento da parte aérea de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* (○) e em condições de estufa (□) por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. **A.** Massa fresca (mg). **B.** Massa seca (mg). Os valores representam a média composta de plantas ($n = 3$) e as barras indicam o desvio padrão.

A taxa de crescimento relativo, calculado a partir das massas fresca e seca da parte aérea (MFpa e MSpa - tabela 4), mostrou maiores valores para as plantas cultivadas *in vitro*, sendo que o maior valor encontrado foi para as plantas com 2 meses de idade cultivadas *in vitro*, nos demais períodos foram similares.

Para os valores de taxa de crescimento relativo, com base na massa fresca e seca das raízes (MFr e MSr - tabela 4), foi possível observar que as plantas do cultivo *in vitro* apresentaram os maiores valores, sendo o período de 2 meses de idade o que apresentou os maiores dados. Nas plantas cultivadas em condições de estufa o maior valor de TCR de massa fresca das raízes foi para o 4º mês de cultivo; os maiores valores de massa seca foram encontrados para o 2º mês de cultivo. Porém, quando se compara a TCR de massas fresca e seca das raízes entre as plantas cultivadas *in vitro* e em condições de estufa, pode-se notar que no 4º mês os valores são similares, independente do tipo de cultivo. Plantas com 12 meses cultivadas *in vitro* têm uma TCR de massa seca de raízes 15 vezes maior que as plantas de mesma idade cultivadas em condições de estufa, mostrando um investimento acentuado no crescimento nesses órgãos.

Comparando os valores da taxa de crescimento relativo, baseado na massa total das plantas, tanto fresca (MFt) como seca (MSt), mostram resultados similares aos dados para a massa da parte aérea (tabela 4).

Tabela 4. Taxa de crescimento relativo (TCR) em massa fresca da raiz: $MFr = (mg_2 mg_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, massa fresca da parte aérea: $MFpa = (mg_2 mg_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, massa fresca total: $MFt = (mg_2 mg_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, massa seca da raiz: $MSr = (mg_2 mg_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, massa seca da parte aérea: $MSpa = (mg_2 mg_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, massa seca total: $MSt = (mg_2 mg_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância.

TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO (TCR)												
Período em meses	<i>In vitro</i>						Estufa					
	MFr	MFpa	MFt	MSr	MSpa	MSt	MFr	MFpa	MFt	MSr	MSpa	MSt
1-2	1,69	1,09	1,15	1,47	1,03	1,1	0,03	0,16	0,15	0,58	0,30	0,34
2-4	0,62	0,67	0,66	0,44	0,74	0,69	0,68	0,57	0,58	0,45	0,63	0,61
4-6	0,76	0,46	0,47	0,95	0,40	0,51	0,15	0,48	0,46	0,36	0,43	0,42
6-8	0,29	0,42	0,43	0,42	0,45	0,44	0,35	0,42	0,42	0,25	0,34	0,34
8-10	0,18	0,30	0,29	(*)	0,12	0,08	0,05	0,01	0,01	0,10	0,11	0,11
10-12	0,50	0,26	0,30	0,65	0,59	0,61	0,11	0,23	0,23	0,04	0,20	0,19

(*) tende a zero

Na razão da massa foliar (RMF - tabela 5), as plantas cultivadas em estufa apresentaram valores maiores quando comparadas com as cultivadas *in vitro* para todos os tempos analisados. Entre as plantas cultivadas em condições de estufa o maior valor de RPF ocorreu naquelas cultivadas por 12 meses.

A razão entre o número de folhas mortas por número de folhas totais (RNF - tabela 5) foi crescente, tanto para as cultivadas *in vitro* como as em condições de estufa, porém analisando os dados das plantas cultivadas *in vitro* foi possível observar que esses valores são maiores. Nas plantas com 12 meses de idade cultivadas *in vitro* a taxa foi o dobro das plantas de mesma idade cultivadas em condições de estufa.

Na razão raiz:parte aérea calculada com base na massa seca (RMS - tabela 5), as plantas cultivadas em condições de estufa apresentaram valores menores quando comparadas com as plantas cultivadas *in vitro* para todos os tempos analisados. As plantas do cultivo *in vitro* com 6 meses de idade apresentaram 4 vezes a razão raiz:parte aérea, quando comparadas com aquelas de mesma idade cultivadas em estufa.

Tabela 5. Razão da massa foliar (RMF), razão do número de folhas mortas por número total de folhas (RNF) e razão da massa seca da raiz por massa seca da parte aérea (RMS) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância.

Meses	<i>In vitro</i>			Estufa		
	RMF	RNF	RMS	RMF	RNF	RMS
1	0,87	-	0,15	0,89	-	0,12
2	0,81	-	0,23	0,86	(*)	0,16
4	0,90	-	0,13	0,90	0,09	0,11
6	0,72	0,11	0,39	0,91	0,09	0,10
8	0,73	0,25	0,37	0,92	0,19	0,08
10	0,79	0,39	0,26	0,92	0,14	0,08
12	0,77	0,43	0,30	0,94	0,20	0,06

(*) tende a zero

Os dados de teor de pigmentos (tabela 6) mostram uma quantidade maior de clorofila *a* nas plantas cultivadas *in vitro*, quando comparadas com aquelas cultivadas em estufa nos períodos analisados, com exceção do 6º e 8º mês. O mesmo não ocorre para os dados de teor de clorofila *b*, onde a ocorrência foi maior nas plantas cultivadas em estufa, com exceção das plantas com 1, 2 e 12 meses de idade. Os dados de teor de carotenóides também foram maiores nas plantas cultivadas *in vitro*.

Tabela 6. Valores médios de pigmentos (µg) por massa fresca (g) das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Os valores representam a média composta ($n = 3$) e indicam o desvio padrão.

Mese s	PIGMENTOS POR MASSA FRESCA ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
	<i>In vitro</i>			Estufa		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides
1	641,47 ± 24,50	229,67 ± 44,14	158,18 ± 15,21	414,09 ± 8,46	193,81 ± 0,91	97,87 ± 0,88
2	616,83 ± 50,73	231,04 ± 48,59	141,98 ± 17,05	435,69 ± 46,58	184,20 ± 18,18	101,10 ± 11,10
4	600,77 ± 32,98	211,57 ± 49,47	144,29 ± 5,17	564,70 ± 12,72	239,32 ± 7,68	127,02 ± 4,75
6	484,56 ± 36,35	183,07 ± 43,26	123,25 ± 6,82	566,26 ± 28,38	239,52 ± 12,77	117,45 ± 5,06
8	531,27 ± 50,11	199,70 ± 32,78	137,84 ± 24,48	499,52 ± 43,88	256,23 ± 42,90	104,70 ± 9,15
10	443,31 ± 46,34	232,74 ± 53,49	103,77 ± 14,05	576,29 ± 19,61	243,50 ± 23,91	128,89 ± 6,21
12	638,94 ± 38,07	242,24 ± 45,26	171,35 ± 27,36	534,82 ± 30,54	232,91 ± 14,20	120,11 ± 7,57

Já os valores da razão clorofila *a* : clorofila *b* (tabela 7) foram maiores nas plantas cultivadas nas condições *in vitro*, com exceção das plantas com 10 meses cultivadas em condições de estufa. Os valores de clorofila *a* + clorofila *b* (tabela 7) apresentaram valores maiores nas plantas cultivadas em condições de estufa nos períodos de 6, 8 e 10 meses quando comparadas com plantas da mesma idade cultivadas *in vitro*.

Tabela 7. Valores de razão clorofila *a* : clorofila *b* e clorofila *a* + clorofila *b* de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância. Os valores representam a média composta ($n = 3$) e indicam o desvio padrão.

PIGMENTOS				
($X \pm S$)				
Meses	<i>In vitro</i>		Estufa	
	Clorofila <i>a</i> : Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i> + Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i> : Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i> + Clorofila <i>b</i>
1	2,86 ± 0,53	871,14 ± 44,90	2,14 ± 0,03	607,90 ± 9,30
2	2,73 ± 0,49	847,87 ± 80,66	2,36 ± 0,03	619,90 ± 64,68
4	2,91 ± 0,46	812,34 ± 82,39	2,36 ± 0,03	804,02 ± 20,11
6	2,80 ± 0,49	667,63 ± 84,27	2,36 ± 0,01	805,78 ± 41,12
8	2,71 ± 0,46	730,97 ± 62,02	1,99 ± 0,42	755,75 ± 37,68
10	1,83 ± 0,54	676,05 ± 68,52	2,39 ± 0,31	819,79 ± 14,57
12	2,71 ± 0,60	881,18 ± 10,14	2,30 ± 0,01	767,73 ± 44,73

O índice de suculência da parte aéreas plantas cultivadas *in vitro* apresentou valores crescentes com o tempo de cultivo *in vitro*, o mesmo ocorreu com as plantas do cultivo em condições de estufa (tabela 8). Porém, as plantas cultivadas *in vitro* apresentaram valores maiores que as plantas em condições de estufa, principalmente a partir do 2º. mês de cultivo, sendo que plantas com 12 meses de idade em cultivo *in vitro* apresentaram o índice de suculência 4,5 vezes maior que as plantas de mesma idade do cultivo em estufa.

Tabela 8. Índice de suculência da parte aérea ($\text{mg } \mu\text{g}^{-1}$) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância. Os valores representam a média composta ($n = 3$).

ÍNDICE DE SUCULÊNCIA ($\text{mg } \mu\text{g}^{-1}$)		
Meses	<i>In vitro</i>	Estufa
1	0,01	0,01
2	0,03	0,01
4	0,11	0,04
6	0,33	0,10
8	0,70	0,24
10	1,42	0,23
12	1,74	0,39

Observando a distribuição de biomassa das plantas cultivadas *in vitro* e em condições de estufa (figuras 33 a 39), pode-se notar que os valores relativos a parte aérea diminuem nas plantas cultivadas *in vitro* e aumentam nas plantas cultivadas em estufa. Nas plantas com 12 meses de idade de cultivo *in vitro* esse valor chega a 77%, enquanto que plantas de mesma idade de cultivo em estufa apresentaram valor de 94%, demonstrando um investimento em biomassa na parte aérea e consequentemente diminuição nas raízes.

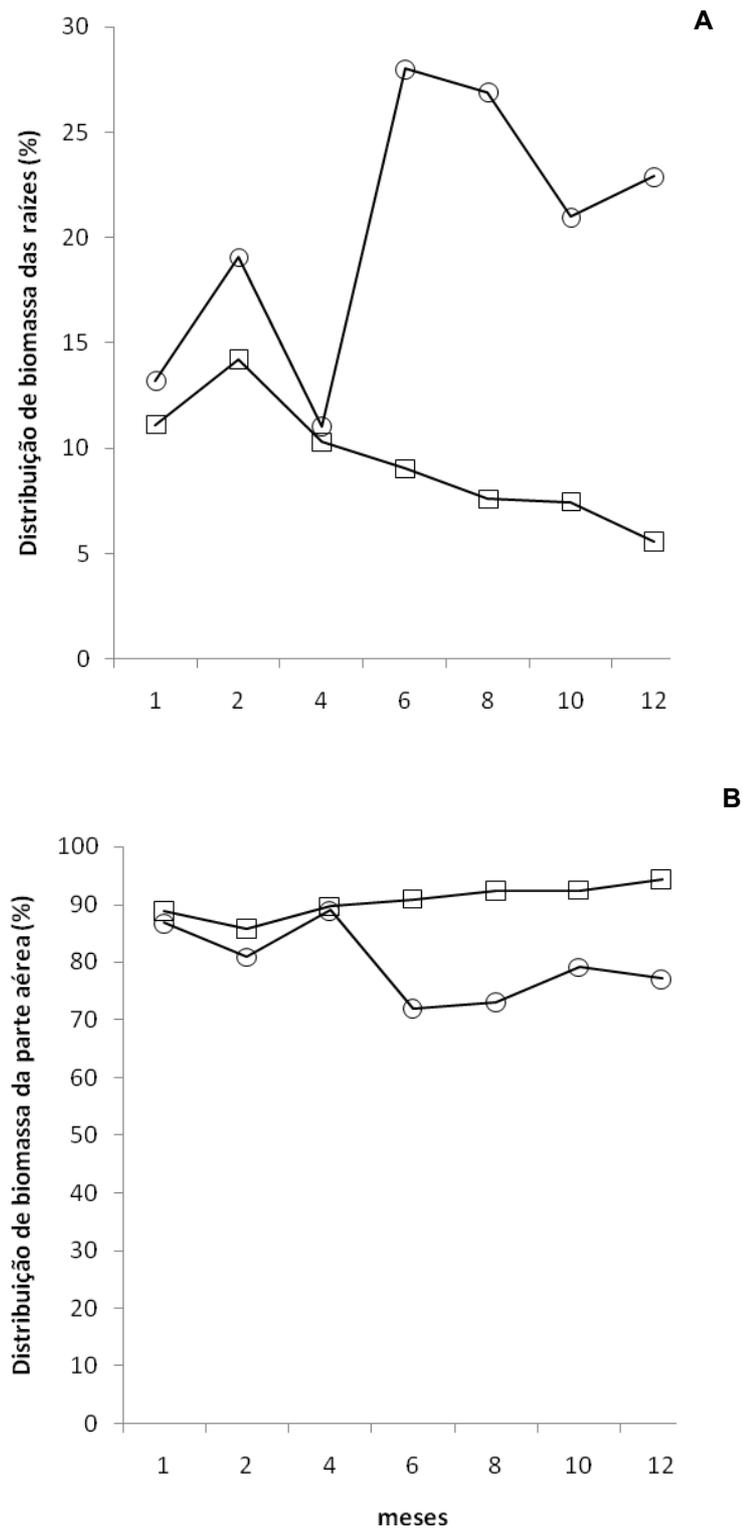
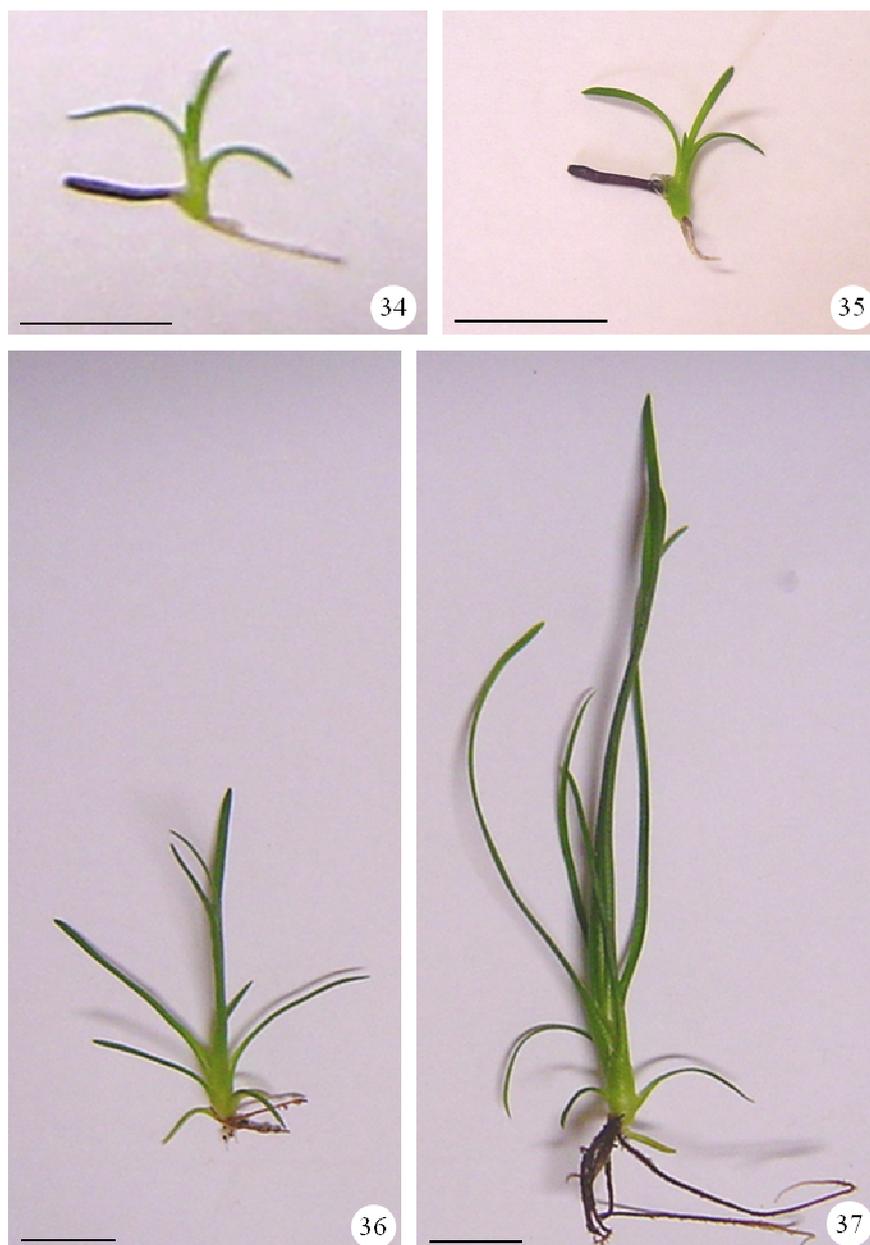


Figura 33. Distribuição de biomassa (calculada com base na massa seca) de raízes e de parte aérea, em porcentagem, de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* (○) e em condições de estufa (□) por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância. Os valores representam a média composta de plantas ($n = 3$).



Figuras 34-37. Plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas em estufa e em cultivo *in vitro*. **34.** Planta cultivada por 1 mês em condições de estufa. **35.** Planta cultivada por 1 mês em cultivo *in vitro*. **36.** Planta cultivada por 6 meses em condições de estufa. **37.** Planta cultivada por 6 meses em cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm.



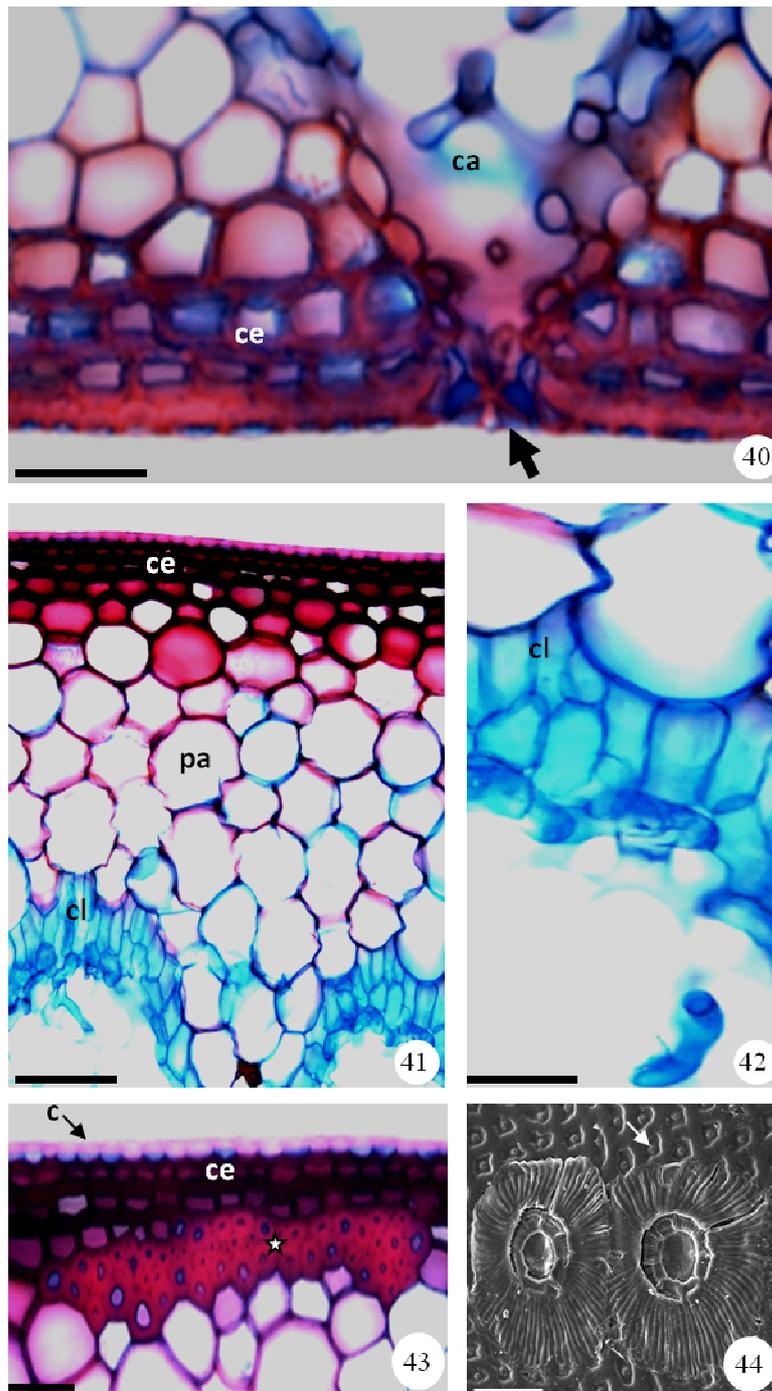
Figuras 38-39. Plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas em estufa e em cultivo *in vitro*. **38.** Planta cultivada por 12 meses em condições de estufa. **39.** Planta cultivada por 12 meses em cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm.

A estrutura foliar da planta adulta de *A. imperialis*, em secção transversal na região mediana do limbo, mostra que a folha é hipoestomática (figura 40) e possui epiderme uniestratificada e lignificada, dotada de escamas em ambas as faces. Células subepidérmicas esclerificadas delimitam externamente o mesofilo, enquanto a região interna é preenchida por parênquima aquífero e clorênquima (figuras 41, 42, 43, 45). Adjacentes às camadas subepidérmicas da face adaxial ocorrem grupos de fibras (figura 43).

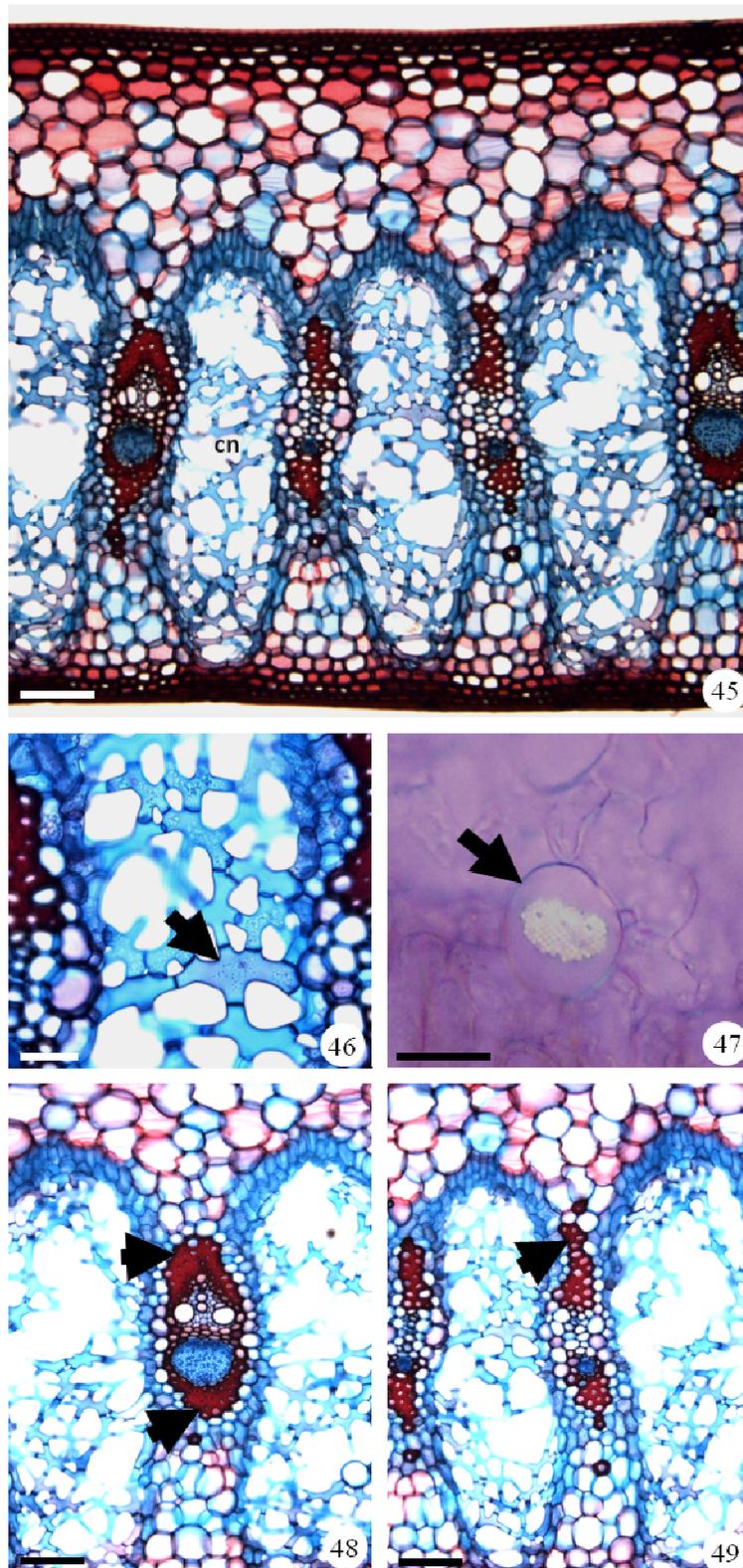
Em vista frontal, exibem escamas dispostas ao acaso revestindo as duas superfícies, observa-se apenas o escudo, que é constituído pelo disco central e pela ala (figura 44). Nesta espécie a distinção entre as células do disco central e da ala. O disco é formado por 4 células centrais, circundadas por dois anéis celulares, sendo o interno constituído por 8 células e denominado pericentral, e o externo formado por dezesseis células e chamado subperiférico. A ala é composta por numerosas células periféricas, alongadas e dispostas radialmente.

No mesofilo observam-se canais de aeração, interrompidos por diafragmas de células braciiformes, que estão ligados à câmara subestomática (figuras 45, 46, 48 e 49). Idioblastos com ráfides ocorrem na periferia desses canais (figura 47).

Os feixes vasculares são do tipo colateral e se distribuem de forma intercalada com os canais de aeração (figura 45). Os feixes de maior calibre apresentam calotas de fibras nos pólos, enquanto que nos de menor calibre ocorrem somente poucas células esclerificadas (figuras 48 e 49).



Figuras 40-44. Anatomia foliar de planta adulta de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. **40-43.** Seções transversais **40.** Superfície foliar face abaxial (seta: estômato). **41.** Aspecto do mesofilo e da epiderme da face adaxial mostrando o parênquima aquífero (pa) e o clorênquima (cl). **42.** Detalhe do mesofilo. **43.** Superfície foliar face adaxial com grupo de fibras de função mecânica (estrela). **44.** Em vista frontal, escamas simétricas e células epidérmicas com corpo silicosos (seta). Barra = 50µm (40, 42-44); 100 µm (41). (c: cutícula; ca: câmara substomática; ce: camadas de células sub-epidérmicas esclerificadas; cl: clorênquima; pa: parênquima aquífero).



Figuras 45-49. Secções transversais de folha de planta adulta de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. **45.** Aspecto geral da lâmina foliar com canais de aeração interrompido por diafragmas de células braciiformes (cn). **46.** Detalhe do canal de aeração célula braciiforme (seta). **47.** Detalhe do idioblasto com ráfides (seta). **48.** Detalhe do feixe vascular de maior calibre com calotas de fibras (setas). **49.** Detalhe do feixe vascular de menor calibre com grupo de fibras (seta). Barra = 150µm (45); 50 µm (46); 25µm (47); 100 µm (48-49).

Secções transversais da porção mediana da lâmina foliar de plantas de 4, 6 e 12 meses de idade, cultivadas *in vitro* e em estufa, mostraram que a folha é hipoestomática e apresenta várias camadas de parênquima aquífero próximas à epiderme (figuras 50-89).

A epiderme é uniestratificada, as células não apresentam o espessamento da parede periclinal, dotada de escamas em ambas as faces (figuras 52, 56-58, 63-68, 71-77, 80-85). Os estômatos se localizam no mesmo nível das demais células epidérmicas (figuras 54, 56, 68, 75-76, 82-84). As células-guardas apresentam cutícula periestomática que se projetam formando cristas (figuras 52, 68, 75, 83-84).

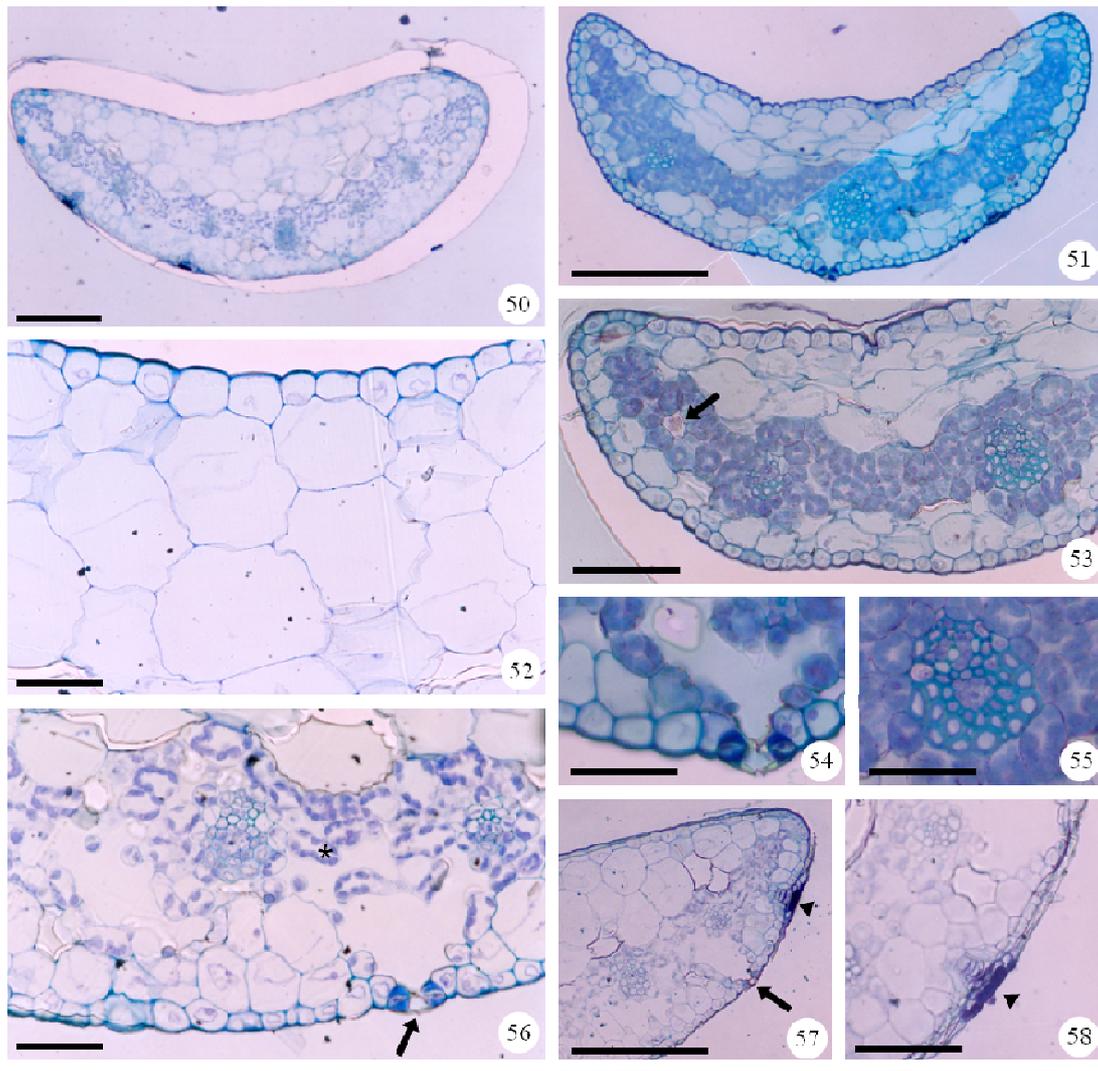
No mesofilo ocorre um parênquima aquífero com número de camadas variando de 3 a 4 tanto na face adaxial quanto abaxial (figuras 50-53, 59-64, 69-74, 78-81, 86). Entre eles segue o parênquima clorofiliano (clorênquima), formado por células isodiamétricas (figuras 56, 65-67, 73, 75, 76, 82, 85, 87-88).

Todos os feixes vasculares são do tipo colateral (figuras 53, 55, 56, 64-67, 72-74, 81-82). Os feixes de maior calibre apresentam calotas de fibras nos dois pólos, enquanto que nos de menor calibre ocorrem somente poucas células esclerificadas em ambos os pólos (figuras 53, 55-56, 61, 64-67, 72-73, 81-82, 85, 87, 88). As plantas jovens não apresentaram células subepidérmicas esclerificadas formando grupos de fibras e canais de aeração.

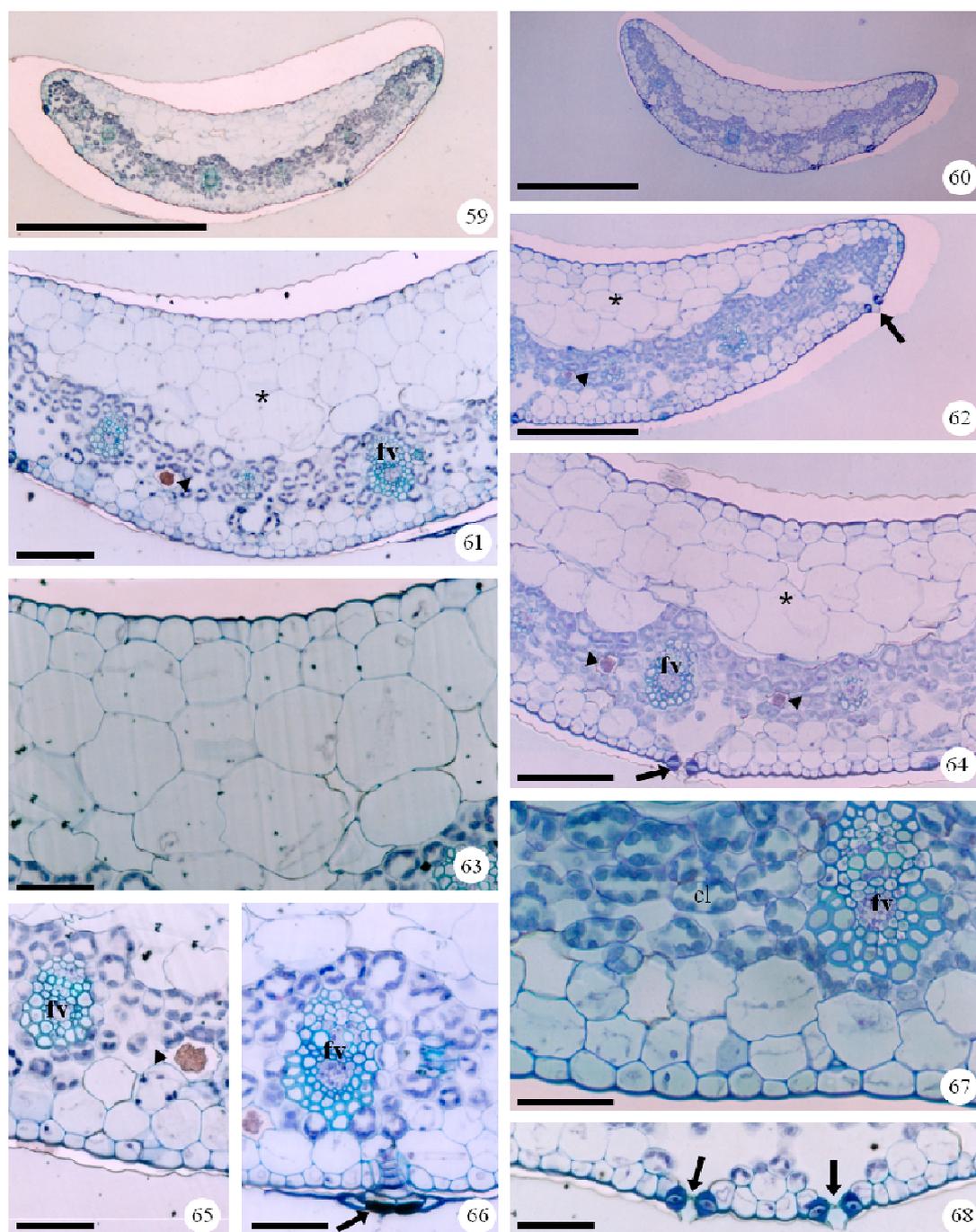
As células do clorênquima, presente nas folhas das plantas adultas, apresentam formato em paliçada ao redor dos canais de aeração e em contato com as células braciiformes, enquanto que nas plantas jovens essas células do clorênquima apresentam forma isodiamétrica.

Quando se comparam as secções transversais das folhas entre as plantas cultivadas *in vitro* com as cultivadas em condições de estufa, é possível observar que as

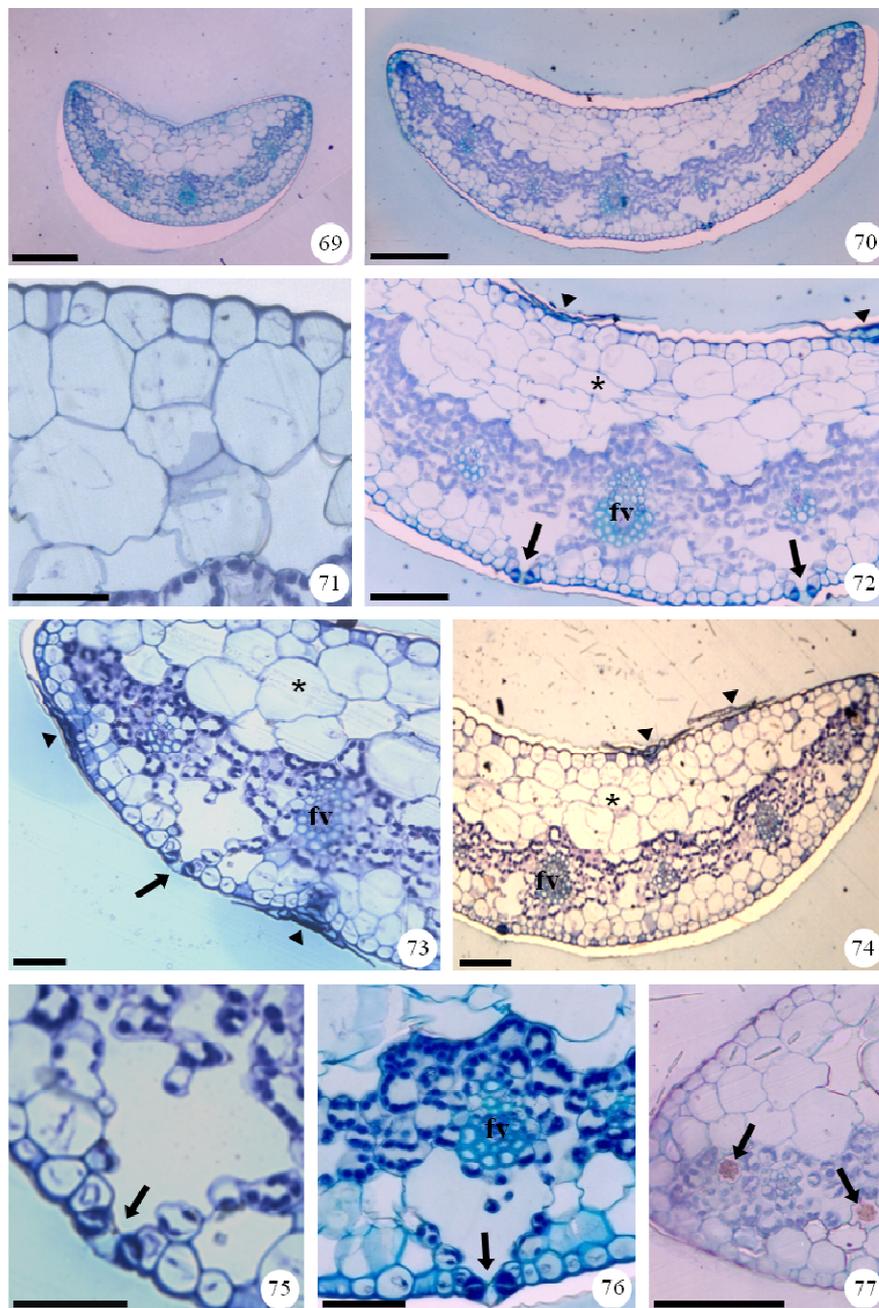
folhas das plantas cultivadas *in vitro* apresentam mesofilo mais estreito, porém a folha é morfológicamente mais larga (figuras 50-51, 59-60, 69-70, 78, 86).



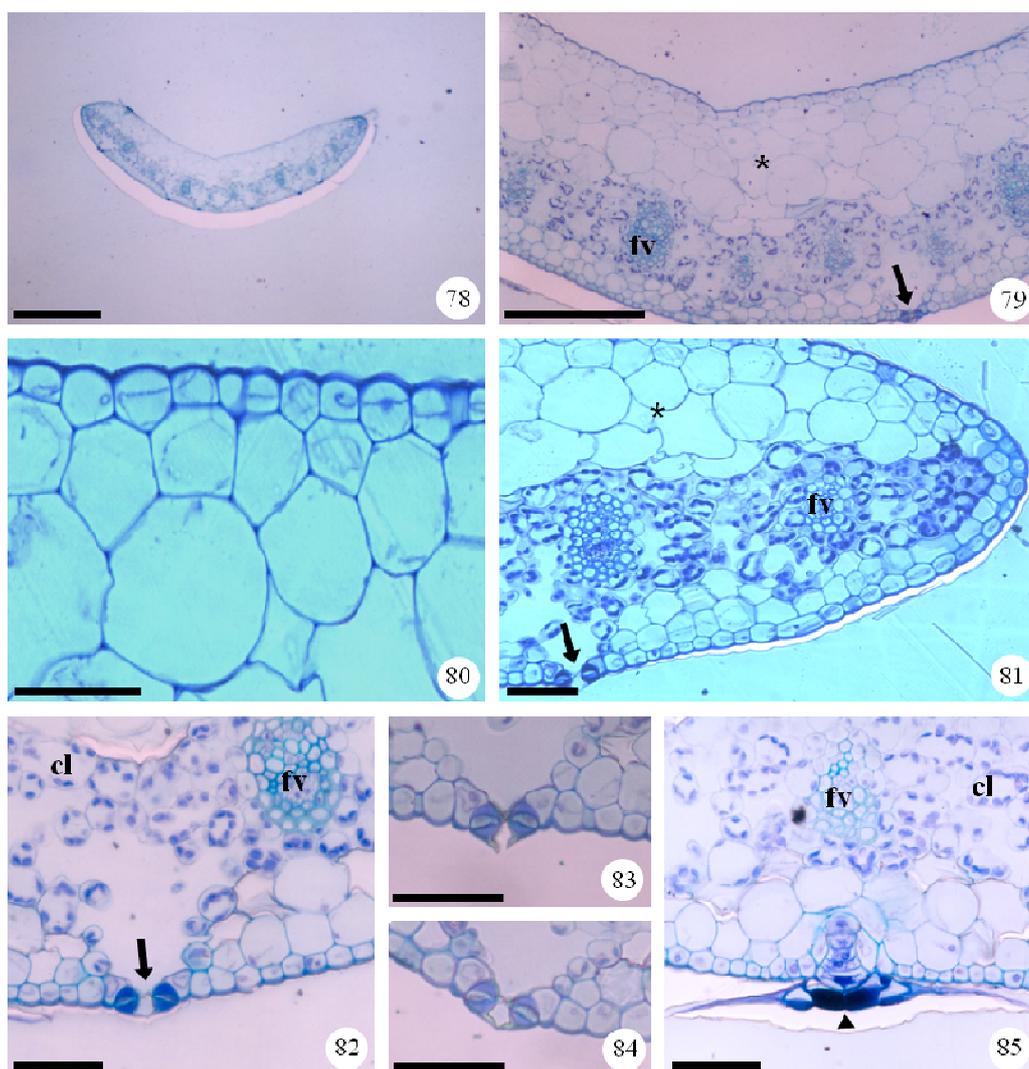
Figuras 50-58. Secções transversais de folha de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 4 meses de cultivo em estufa. **50-51.** Aspecto geral da secção do terço mediano foliar. **52.** Detalhe da epiderme adaxial e parênquima aquífero. **53.** Detalhe da borda com idioblastos (seta). **54.** Estômato com cutícula peristomática. **55.** Feixe vascular. **56.** Aspecto do mesofilo destacando clorênquima (asterisco), epiderme abaxial e estômato (seta). **57.** Aspecto da borda com estômato (seta) e escama (cabeça de seta) **58.** Detalhe da escama (cabeça de seta). Barra = 200 µm (50); 100 µm (51, 57-58); 50 µm (52-56).



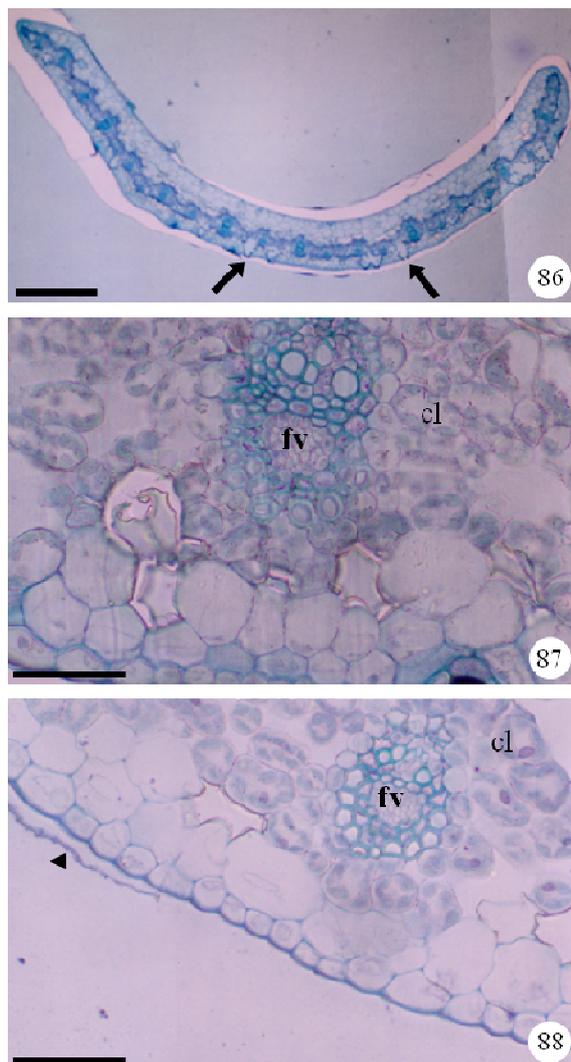
Figuras 59-68. Seções transversais de folha de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 4 meses de cultivo *in vitro*. **59-60.** Aspecto geral da secção do terço mediano foliar. **61.** Detalhe do mesofilo central com parênquima aquífero (asterisco) e idioblato (cabeça de seta). **62.** Detalhe do mesofilo com parênquima aquífero (asterisco) e idioblato (cabeça de seta) e borda com estômato (seta). **63.** Detalhe da epiderme adaxial e parênquima aquífero. **64-65.** Aspecto do mesofilo com parênquima aquífero (asterisco), idioblato (cabeça de seta) e estômato (seta). **66.** Detalhe da escama (seta). **67.** Aspecto do clorênquima (cl). **68.** Estômatos (setas) com cutícula peristomática. (fv: feixe vascular). Barra = 200 µm (59-60); 100 µm (61-62); 50 µm (63-68).



Figuras 69-77. Secções transversais de folha de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 6 meses de cultivo em estufa. **69-70.** Aspecto geral da secção do terço mediano foliar. **71.** Detalhe da epiderme adaxial e parênquima aquífero. **72.** Detalhe do mesofilo central com parênquima aquífero (asterico), escamas (cabeça de seta) e estômato (seta). **73-74.** Detalhe da borda com parênquima aquífero (asterico), escamas (cabeça de seta) e estômato (seta). **75.** Estômatos com cutícula peristomática (seta). **76.** Aspecto do mesofilo, destacando clorênquima (asterisco) e estômato (seta). **77.** Aspecto do mesofilo com idioblasto (cabeça de seta). (fv: feixe vascular). Barra = 200 µm (69-70); 50 µm (71, 73, 75-76); 100 µm (72, 74, 77).



Figuras 78-85. Seções transversais de folha de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 6 meses de cultivo *in vitro*. **78.** Aspecto geral da seção do terço mediano foliar. **79.** Detalhe do mesofilo central com parênquima aquífero (asterisco) e estômato (seta). **80.** Detalhe da epiderme adaxial e parênquima aquífero. **81.** Detalhe da borda com parênquima aquífero (asterisco) e estômato (seta). **82.** Aspecto do mesofilo, destacando clorênquima (cl) e estômato (seta). **83-84.** Estômatos com cutícula peristomática (setas). **85.** Aspecto do mesofilo, destacando feixe vascular (fv), clorênquima (cl) e escama (seta). (fv: feixe vascular). Barra = 500 μm (78); 100 μm (79 e 81); 50 μm (80, 82-85).



Figuras 86-88. Secções transversais de folha de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com 12 meses de cultivo *in vitro* e em estufa. **86.** Aspecto geral da secção do terço mediano foliar de planta cultivada *in vitro*. **87.** Detalhe do mesofilo com feixe vascular (fv) e clorênquima (cl) em folha de planta cultivada *in vitro*. **88.** Detalhe do mesofilo com feixe vascular (fv) e clorênquima (cl) em folha de planta cultivada em estufa. Barra = 500 µm (86); 50 µm (87-88).

IV.4. COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO* E APÓS O PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO (figuras 89 a 92; tabelas 9 a 14)

O valor de sobrevivência das plantas transferidas das condições *in vitro* foi de 100%, exceto para o período de 4 meses de permanência *in vitro* que apresentou 96% de sobrevivência. Em todos os tratamentos (tempo de permanência no cultivo *in vitro*) utilizados não foram observadas variações morfológicas e alterações na pigmentação das folhas.

A análise comparativa dos dados das plantas provenientes do cultivo *in vitro* e após 2 meses de aclimatação em condições de estufa mostrou um aumento dos valores dos dados biométricos ao longo do tempo.

Com relação aos parâmetros biométricos das raízes, pode-se observar que em todos os períodos analisados ocorreu um aumento no número das raízes (figura 89A) das plantas após o período de aclimatação, sendo os períodos de cultivo *in vitro* de 6 e 8 meses que apresentaram um aumento no número de raízes após a aclimatação (tratamentos IV e V), com adição de mais de 4 raízes. Os dados de comprimento de raízes (figura 89B) também apresentaram aumento em todos os períodos analisados, porém o tratamento III (4 meses em condições *in vitro* + 2 meses em estufa) foi o que apresentou o maior aumento no comprimento das raízes de cerca de 1,5 cm.

Os dados de massa das raízes, tanto fresca como seca, apresentaram aumento em todos os períodos analisados. Os dados de massa fresca das raízes (figura 90A) apresentaram as maiores diferenças entre os valores nos períodos de cultivo *in vitro* de 6 e 12 meses, quando comparados com os dados após o período de aclimatação (tratamentos IV e VII). O mesmo não ocorreu com os valores de massa seca das raízes

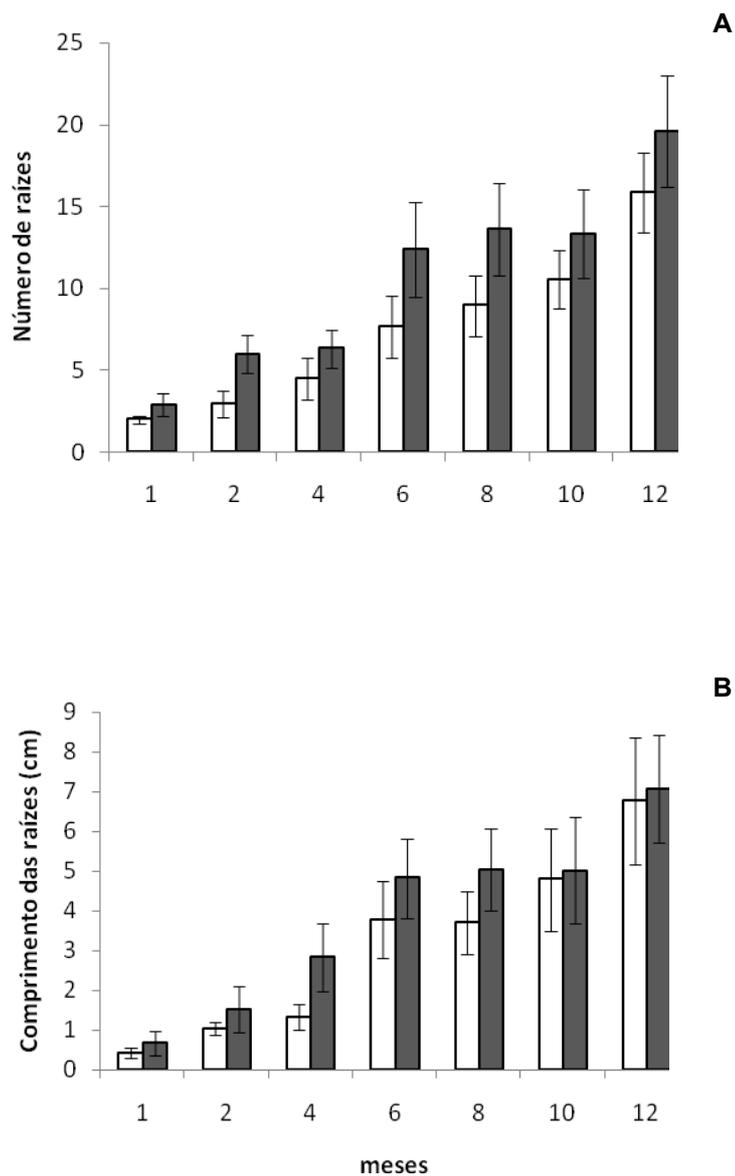


Figura 89. Crescimento de raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses (□) e submetidas em seguida à aclimação por 2 meses (■). **A.** Número. **B.** Comprimento (cm). Os valores representam a média de 50 plantas e as barras indicam o desvio padrão.

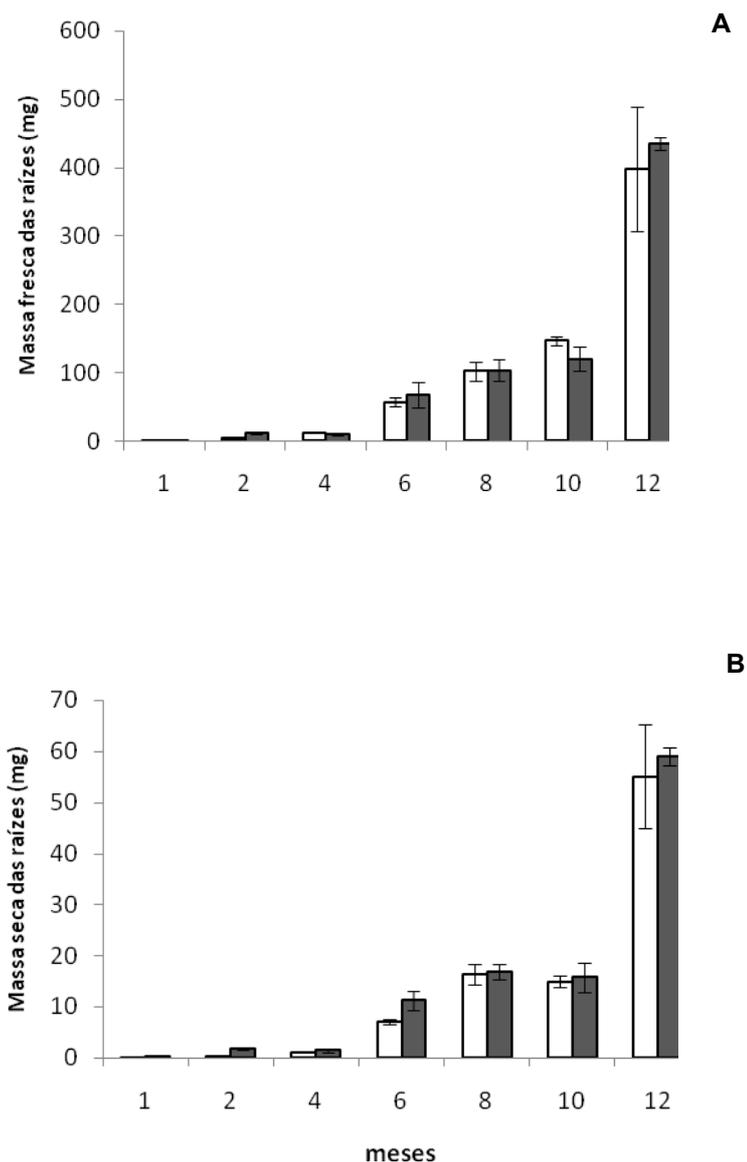


Figura 90. Crescimento de raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses (□) e submetidas em seguida à aclimação por 2 meses (■). **A.** Massa fresca (mg). **B.** Massa seca (mg). Os valores representam a média composta ($n = 3$) de plantas e as barras indicam o desvio padrão.

(figura 90B), que apresentaram maior diferença no período de 6 meses de cultivo *in vitro*, enquanto nos demais períodos os valores são similares.

Os dados biométricos referentes à parte área, como o número de folhas sadias (figura 91A), apresentaram diferenças nos primeiros meses, sendo que o tratamento II (2 meses *in vitro* e 2 meses de aclimação) apresentou o dobro de folhas sadias quando comparado com os valores antes da aclimação; a partir dos 4 meses de cultivo *in vitro* os valores são similares, com aproximadamente 11 folhas sadias por planta. Porém, a partir do tratamento IV (4 meses *in vitro* e 2 meses em estufa) ocorreu uma diminuição no número de folhas sadias quando comparado com o das plantas cultivadas *in vitro*. O número de folhas mortas (figura 91B), no cultivo *in vitro*, só começou a ocorrer a partir do 6º mês, enquanto para as plantas aclimatadas já ocorreu a partir do tratamento II (2 meses *in vitro* + 2 meses em estufa). O tratamento que apresentou o maior número de folhas mortas foi o tratamento IV (6 meses de cultivo *in vitro* e após a aclimação).

Quanto ao comprimento das folhas (figura 92C), as plantas apresentaram aumento em todos os períodos estudados, porém o tratamento IV (6 meses *in vitro* + 2 meses em estufa) foi o que apresentou maior diferença entre os valores com cerca de 9 cm.

Para a parte aérea, a diferença entre os valores das plantas do cultivo *in vitro* após o período de aclimação, foi maior no tratamento VII (12 meses de cultivo *in vitro* e após a aclimação), ocorrendo um aumento de massa fresca da parte aérea (figura 92A) de mais de 1000 mg. Os valores de massa seca da parte aérea (figura 92B) apresentaram um aumento após a aclimação, independente do tempo de cultivo nas condições *in vitro*, sendo o período de 8 meses *in vitro* o que apresentou a maior diferença quando comparado com os dados obtidos após os 2 meses de aclimação.

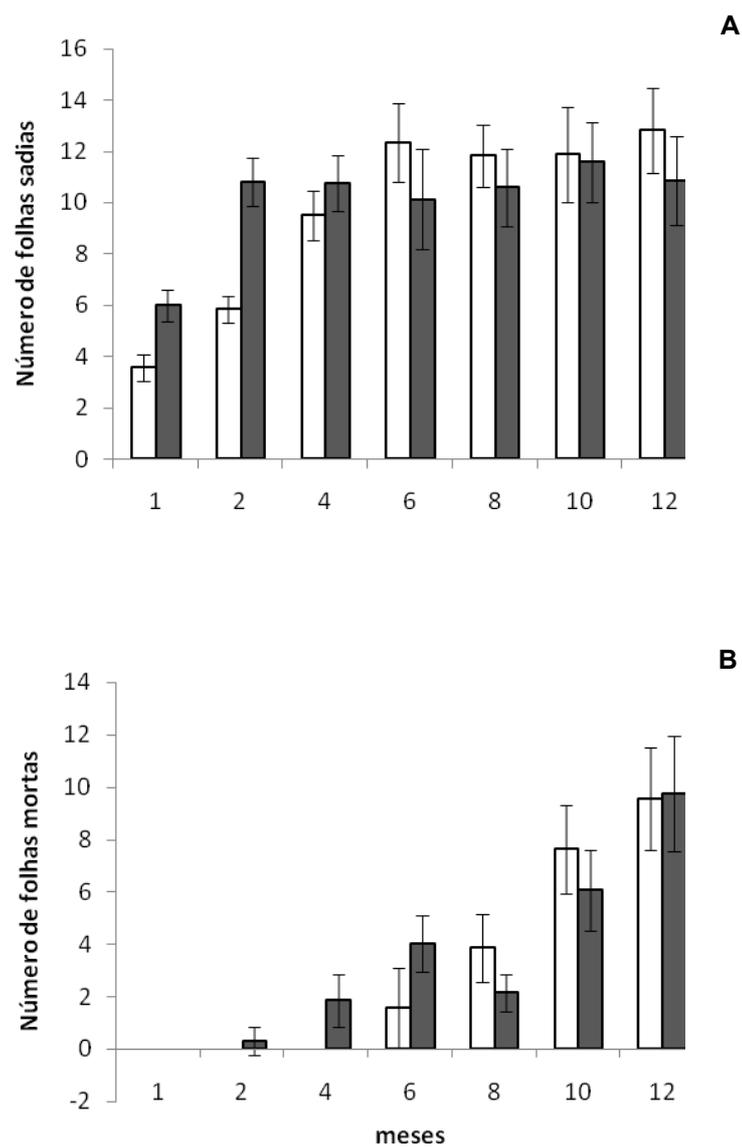


Figura 91. Crescimento da parte aérea de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses (□) e submetidas em seguida à aclimação por 2 meses (■). **A.** Número de folhas sadias. **B.** Número de folhas mortas. Os valores representam a média e as barras indicam o desvio padrão.

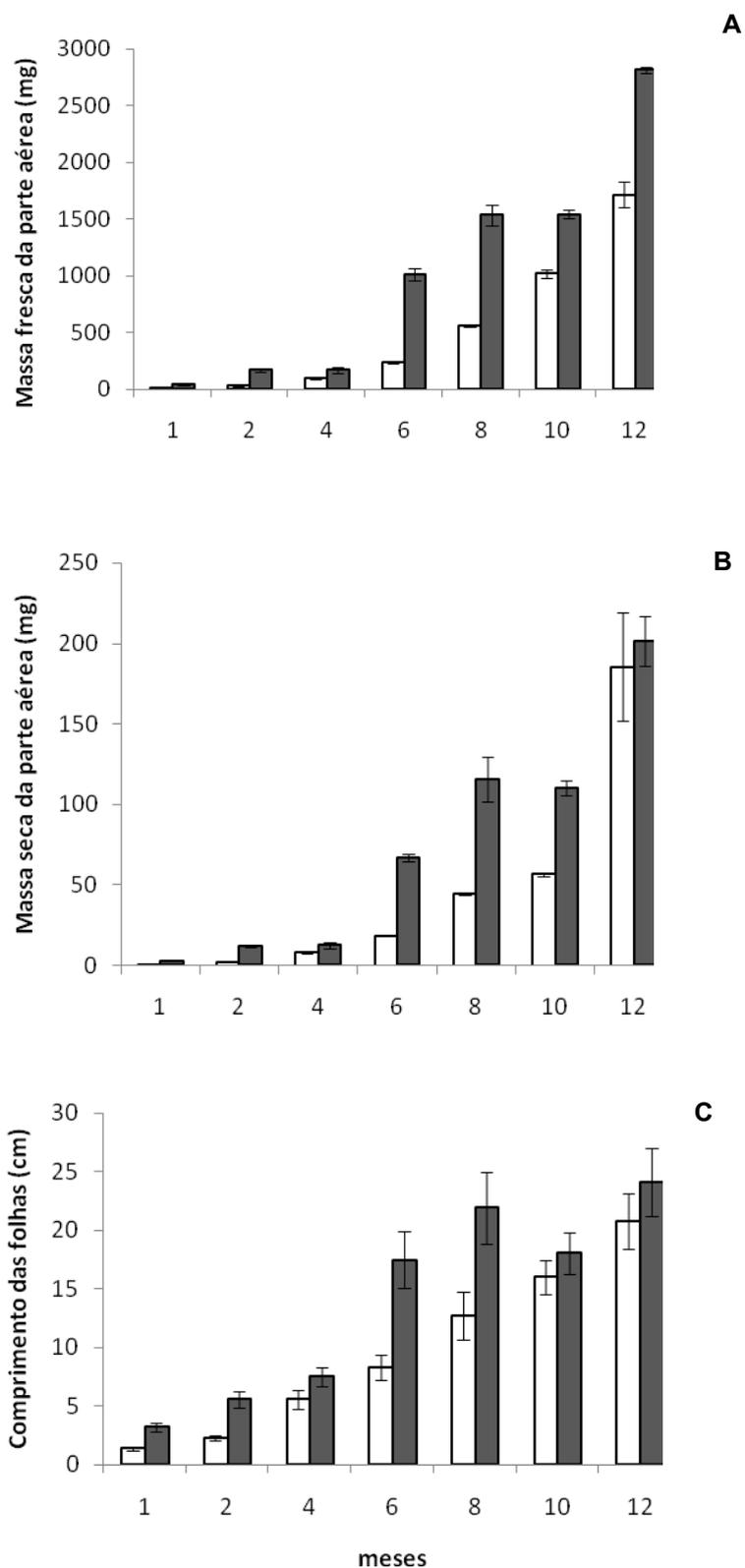


Figura 92. Crescimento da parte aérea de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses (□) e submetidas em seguida à aclimação por 2 meses (■). **A.** Massa fresca (mg). **B.** Massa seca (mg). **C.** Comprimento (cm). Os valores representam a média e as barras indicam o desvio padrão.

Para os valores de taxa de crescimento relativo, com base na massa fresca e seca da parte aérea (MFpa e MSpa – tabela 9), os maiores dados foram relativos ao tratamento II (2 meses de cultivo *in vitro* + 2 meses em estufa).

Para os valores de taxa de crescimento relativo, com base na massa fresca e seca das raízes (MFr e MSr - tabela 9), foi possível observar que as plantas do tratamento II (2 meses de cultivo *in vitro* + 2 meses em estufa) apresentaram os maiores dados tanto para massa fresca como seca, quando comparadas com os demais tratamentos, demonstrando que nesse período de aclimação, a partir de plantas cultivadas *in vitro* por 2 meses, ocorreu o maior acúmulo de biomassa. Já as plantas do tratamento VII (12 meses de cultivo *in vitro* + 2 meses em estufa) foram as que apresentaram os menores valores de TCR. Para a massa fresca das raízes, as plantas do tratamento VII apresentaram cerca de 10% do crescimento da TCR das plantas do tratamento II e para a massa seca as plantas do tratamento VII apresentaram 5% de TCR quando comparadas com as plantas do tratamento II.

Comparando os valores da taxa de crescimento relativo, baseado na massa total das plantas, tanto fresca (MFt) como seca (MSt), mostram resultados similares aos dados para a massa da parte aérea (tabela 9), com exceção das plantas do tratamento I que apresentaram o dobro de TCR da massa fresca total quando comparado com o valor da TCR para a massa fresca da parte aérea.

Na razão da massa foliar (RPF - tabela 10), as plantas aclimatadas apresentaram valores maiores quando comparadas com as cultivadas *in vitro* para todos os tempos analisados. Entre as plantas aclimatadas o maior valor de RPF ocorreu nas plantas cultivadas por 4 meses em condições *in vitro* (tratamento III).

A razão entre o número de folhas mortas por número de folhas totais (RNF-tabela 10), ou a porcentagem de folhas mortas por planta, foi crescente entre as plantas cultivadas *in vitro*, porém analisando os dados das plantas aclimatadas é possível

observar que esses valores variam, plantas do tratamento III (4 meses cultivadas *in vitro* + 2 meses em estufa) apresentaram 14% de folhas mortas, já plantas do tratamento IV (6 meses cultivadas *in vitro* + 2 meses em estufa) apresentaram o dobro de folhas mortas. Nas plantas com 12 meses cultivadas nas condições *in vitro* a porcentagem de folhas mortas chega a mais de 40%, permanecendo esse valor mesmo depois do período de aclimação.

Na razão raiz : parte aérea (RMS - tabela 10), as plantas aclimatadas em todos os tratamentos apresentaram valores menores quando comparadas com as plantas cultivadas *in vitro* para todos os tempos analisados. As plantas do tratamento IV (6 meses de cultivo *in vitro* + 2 meses em estufa) apresentaram o dobro da RMS quando comparadas com os valores daquelas antes do período de aclimação. Os maiores valores de razão R:PA foram encontrados nas plantas cultivadas *in vitro* com 6 e 8 meses.

Tabela 9. Taxa de crescimento relativo (TCR) em massa fresca da raiz: MFr = (mg₂ mg₁⁻¹) mês⁻¹, massa fresca da parte aérea: MFpa = (mg₂ mg₁⁻¹) mês⁻¹, massa seca da raiz: MSr = (mg₂ mg₁⁻¹) mês⁻¹, massa seca da parte aérea: MSpa = (mg₂ mg₁⁻¹) mês⁻¹ das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância.

TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO (TCR)						
Meses <i>In vitro</i>	MFr	MFpa	MFt	MSr	MSpa	MSt
1	0,43	0,77	1,51	0,57	0,64	0,63
2	0,59	0,95	0,92	0,69	0,90	0,87
4	(*)	0,30	0,27	0,17	0,22	0,22
6	0,09	0,73	0,68	0,23	0,65	0,56
8	0,01	0,51	0,46	0,01	0,47	0,39
10	(*)	0,21	0,18	0,02	0,33	0,28
12	0,04	0,25	0,22	0,03	0,04	0,04

(*) tende a zero

Tabela 10. Razão da massa foliar (RMF), razão do número de folhas mortas por número total de folhas (RNF) e razão da massa seca da raiz por massa seca da parte aérea (RMS) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância.

Meses	<i>In vitro</i>			Aclimatadas		
	RMF	RNF	RMS	RMF	RNF	RMS
1	0,87	-	0,15	0,88	-	0,13
2	0,81	-	0,23	0,87	(*)	0,15
4	0,90	-	0,13	0,89	0,15	0,12
6	0,72	0,11	0,39	0,85	0,28	0,17
8	0,73	0,24	0,37	0,87	0,17	0,14
10	0,79	0,39	0,26	0,87	0,34	0,14
12	0,77	0,43	0,30	0,77	0,47	0,29

(*) tende a zero

Os dados de teor de pigmentos (tabela 11) mostram uma quantidade maior de clorofila *a* nas plantas cultivadas *in vitro* quando comparada com as plantas depois do período de aclimação, em todos os períodos analisados. O mesmo ocorre para os dados de teor de clorofila *b* e carotenóides, com exceção das plantas do tratamento VII (12 meses de cultivo *in vitro* + 2 meses em estufa) que apresentou um aumento no teor de clorofila *b*.

Tabela 11. Valores médios de pigmentos (μg) por massa fresca (g) das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses. Os valores representam a média composta ($n = 3$) e indicam o desvio padrão.

PIGMENTOS POR MASSA FRESCA ($\mu\text{g g}^{-1}$)						
$(\bar{X} \pm S)$						
Meses	<i>In vitro</i>			Aclimatadas		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides
1	641,47 \pm 24,50	229,67 \pm 44,14	158,18 \pm 15,21	438,54 \pm 17,72	158,02 \pm 37,10	110,67 \pm 8,68
2	616,83 \pm 50,73	231,04 \pm 48,59	141,98 \pm 17,05	492,04 \pm 46,23	217,68 \pm 21,07	104,65 \pm 8,29
4	600,77 \pm 32,98	211,57 \pm 49,47	144,29 \pm 5,17	502,45 \pm 24,48	184,80 \pm 66,28	117,31 \pm 10,28
6	484,56 \pm 38,36	183,07 \pm 47,79	123,25 \pm 6,96	344,36 \pm 26,28	145,61 \pm 41,12	88,39 \pm 17,38
8	531,27 \pm 50,11	199,70 \pm 32,78	137,84 \pm 24,48	314,77 \pm 27,57	199,37 \pm 24,50	65,32 \pm 12,98
10	443,31 \pm 62,85	232,74 \pm 45,21	103,77 \pm 30,45	305,44 \pm 29,44	177,47 \pm 32,56	71,14 \pm 5,01
12	638,94 \pm 38,07	242,24 \pm 45,26	171,35 \pm 27,36	596,57 \pm 22,15	270,59 \pm 76,38	159,72 \pm 17,81

Já os valores da razão clorofila *a* : clorofila *b* e clorofila *a* + clorofila *b* (tabela 12) foram maiores nas plantas cultivadas nas condições *in vitro*, independente do período analisado, quando comparados com as plantas aclimatadas.

Tabela 12. Valores de razão clorofila *a* : clorofila *b* e clorofila *a* + clorofila *b* de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância. Os valores representam a média composta ($n = 3$) e indicam o desvio padrão.

PIGMENTOS				
$(X \pm S)$				
Meses	<i>In vitro</i>		Aclimatadas	
	Clorofila <i>a</i> : Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i> + Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i> : Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i> + Clorofila <i>b</i>
1	2,86 ± 0,53	871,14 ± 44,90	2,86 ± 0,53	596,57 ± 51,14
2	2,73 ± 0,49	847,87 ± 80,66	2,26 ± 0,01	709,71 ± 67,28
4	2,91 ± 0,46	812,34 ± 82,39	2,94 ± 0,93	687,25 ± 88,47
6	2,80 ± 0,49	667,63 ± 84,27	2,51 ± 0,79	489,97 ± 15,13
8	2,71 ± 0,46	730,97 ± 62,02	1,60 ± 0,31	514,14 ± 3,27
10	1,83 ± 0,54	676,05 ± 68,52	1,96 ± 0,33	482,91 ± 57,67
12	2,71 ± 0,60	881,18 ± 10,14	2,30 ± 0,53	867,16 ± 93,13

O índice de suculência da parte aérea das plantas cultivadas *in vitro* apresentou valores crescentes com o tempo de cultivo, o mesmo ocorreu com as plantas de todos os tratamentos (tabela 13). Porém, as plantas do tratamento V (8 meses *in vitro* + 2 meses em estufa) foram as que apresentaram maior diferença entre o índice de suculência após a aclimação.

Tabela 13. Índice de suculência da parte aérea de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância. Os valores representam a média composta ($n = 3$).

ÍNDICE DE SUCULÊNCIA (mg μg^{-1})		
Meses	<i>In vitro</i>	Aclimatadas
1	0,01	0,06
2	0,03	0,22
4	0,11	0,23
6	0,33	1,94
8	0,70	2,76
10	1,42	2,96
12	1,74	3,01

Observando a distribuição de biomassa das plantas (tabela 14) cultivadas *in vitro* e após o período de aclimação, pode-se notar que cerca de 80% da biomassa foi alocada para a parte aérea. As plantas após o período de aclimação apresentaram um aumento nos valores da distribuição de biomassa da parte aérea e uma diminuição nos valores para as raízes.

Tabela 14. Distribuição de biomassa (calculada com base na massa seca) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimatação por 2 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância. Os valores representam a média composta ($n = 3$).

DISTRIBUIÇÃO DE BIOMASSA (%)				
Meses	<i>In vitro</i>		Aclimatadas	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
1	13,22	86,78	11,73	88,27
2	19,08	80,62	13,38	86,62
4	11,04	88,96	10,04	89,56
6	28,00	72,00	14,40	85,60
8	26,89	73,11	12,74	87,26
10	20,96	79,14	12,51	87,49
12	22,89	77,11	22,64	77,36

V. DISCUSSÃO

A propagação de plantas através de técnicas de cultivo *in vitro* apresenta, segundo vários autores, inúmeras vantagens se comparadas com a produção em sistemas convencionais em estufa (Debergh & Maene 1981, Pierik 1987, Ahuja 1993, Debergh 1994, Fay 1994, Zornig 1996, AboEl-Nil 1997, Engelmann 1997, Thorpe & Harry 1997, Hartmann *et al.* 2002, Carneiro & Mansur 2004).

Este trabalho se propôs a comparar o desenvolvimento de plantas de *Alcantarea imperialis*, conhecida como bromélia imperial, cultivadas *in vitro* e em condições de estufa, a partir de sementes e sem o uso de reguladores, de modo a relatar as diferenças no crescimento das plantas nesses dois tipos de cultivo no decorrer do tempo.

O uso da semente como explante para o início do cultivo *in vitro* se justifica pela grande quantidade produzida por esta espécie, além do fato de garantir, assim, diversidade genética das plantas obtidas, fator de extrema importância pelo fato de se tratar de uma espécie ameaçada de extinção (Dodds 1991 *apud* Fay 1994, Mercier & Nievola 2003, Carneiro & Mansur 2004). Embora seja frequente o uso de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro*, essas substâncias têm sido consideradas como indutoras de variações somaclonais (Ziv *et al.* 1986, Karp 1995, Zornig 1996, Kuksova *et al.* 1997, Thorpe & Harry 1997, Gaspar *et al.* 2002, Joyce *et al.* 2003, van Staden *et al.* 2006), o que os tornam indesejáveis quando se objetiva uma produção homogênea.

Na natureza não há a ocorrência de indivíduos clonais de *A. imperialis* (Bárbara *et al.* 2009) e, dessa forma, a propagação da espécie tem sido realizada exclusivamente por sementes. Não foram encontrados trabalhos que comparem a germinação das sementes dessa bromélia *in vitro* e em gerbox, utilizando papel de filtro para reter a água.

Os fatores que influenciam a germinação das sementes são a água, o oxigênio, a luz, a temperatura, entre outros (Mayer & Poljakoff-Mayber 1982, Labouriau 1983, Bewley & Black 1994, Castro *et al.* 2004). Para a bromélia imperial, a influência da temperatura na germinação destas sementes já foi analisada por Mollo (2009), porém não foram encontrados na literatura informações sobre o efeito da luz na germinação dessa espécie.

Segundo Borges & Rena (1993) e Takaki (2001), a sensibilidade das sementes à luz é bastante variável, de acordo com a espécie, havendo sementes cuja germinação é influenciada positivamente ou negativamente e, ainda, sementes indiferentes a ela. A ativação do processo germinativo das sementes pela luz está ligada a um sistema de pigmento denominado fitocromo, uma cromoproteína solúvel em água de coloração azulada com máximos de absorção no azul e no vermelho.

As sementes de várias espécies de Bromeliaceae são citadas como sendo fotoblásticas positivas como nos trabalhos de Downs (1964), Mercier & Guerreiro Filho (1990), Pinheiro & Borghetti (2003), Pompelli (2006), Wiesbauer *et al.* (2007).

Neste trabalho, foi possível verificar que as sementes da bromélia imperial são fotoblásticas positivas, pois não germinaram na ausência de luz, independente do tipo de cultivo utilizado (papel de filtro e meio de cultura). Há, no entanto, outra espécie de Bromeliaceae, *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer, cujas sementes germinam tanto na presença como na ausência de luz e em uma larga amplitude térmica de 10 a 45°C, demonstrando que a germinação não é um fator limitante nesse caso (Vieira *et al.* 2007).

Segundo Pinheiro & Borghetti (2003), em trabalho sobre a germinação das sementes das bromélias *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesbach e *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Schultes F.) Mez em que utilizaram diferentes condições de temperatura e luminosidade a fim de examinar a capacidade das sementes em germinar em distintas

situações microclimáticas, as sementes se mostraram fotoblásticas positivas, porém vale ressaltar que essa necessidade pode ser limitada em microsítios específicos onde a luz e a temperatura podem variar, desde a presença de cobertura vegetal no solo como em condições de soterramento.

Como os espécimes de *A. imperialis* ocorrem em áreas íngremes com intensa luminosidade pela ausência de cobertura vegetal alta, há grande probabilidade de ocorrência de deslizamentos que, conseqüentemente, podem levar ao soterramento de suas sementes e prejudicar o processo germinativo.

A germinação de sementes *in vitro*, pode ser indicada em casos em que as sementes não germinem em condições *ex vitro*, como estudo realizado por Pompelli (2006), em que o autor concluiu que tais sementes não possuem barreira germinativa quando colocadas *in vitro*, ao contrário do que acontece na natureza, onde encontram outras barreiras, provavelmente de natureza física, que as impossibilite de germinar.

Para a *A. imperialis* não foram observadas diferenças significativas entre a porcentagem de germinação *in vitro* e na gerbox em papel de filtro, embora no ambiente *in vitro* o teor de umidade seja maior e constante.

Dentre os trabalhos sobre germinação de sementes de *A. imperialis*, pode-se destacar o de Naves (2001), que testou o meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) com diferentes concentrações de macronutrientes e fotoperíodo de 16 horas, bem como comparou a germinação *in vitro* com a obtida em casa de vegetação. As melhores taxas de germinação ocorreram na concentração de 50 a 75% dos macronutrientes do meio de cultura e, ainda, os dados foram superiores na germinação *in vitro* quando comparados com aqueles obtidos na casa de vegetação.

Outro estudo com sementes de *A. imperialis* foi o de Mollo (2009), que testou a germinação das sementes *in vitro*, em diferentes temperaturas, não encontrando diferenças

na porcentagem de emergência das plântulas entre as temperaturas de 26 e 30°C. Nesse trabalho, porém, avaliou-se a porcentagem de emergência das plântulas, enquanto no atual estudo foi avaliada a porcentagem de germinação, sendo considerada como germinada, do ponto de vista morfológico, a semente que apresentou rompimento do tegumento e a emergência da base do cotilédone, mesmo parâmetro utilizado por Pereira *et al.* (2008) para a germinação da mesma espécie.

Pereira *et al.* (2008) observaram a germinação das sementes da bromélia imperial, do ponto de vista morfológico, a partir do sétimo dia da embebição das sementes, enquanto no presente trabalho verificou-se que isso ocorre em média aos quatro dias após o plantio. Com relação à porcentagem de germinação, os mesmos autores, utilizaram como substrato o papel de filtro e observaram 88% de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) entre 7 e 14 dias. Comparando com os dados do presente estudo essa diferença pode ter sido ocasionada pelo fato das sementes passarem pela desinfestação superficial durante mais de 1 hora, este processo envolve o contato das mesmas com substâncias abrasivas como o hipoclorito de sódio, além disso, foram mantidas sob agitação constante e, com isso, podem ter o processo de embebição facilitado.

Portanto, em condições *in vitro* utilizadas neste trabalho, às elevadas porcentagens de germinação na presença de luz e o curto período para a germinação, associados à baixa ocorrência de plantas anômalas, são características importantes para a produção de plantas desta espécie, visando à sua preservação e comercialização.

Após o estudo sobre a germinação de *A. imperialis*, foi possível acompanhar o desenvolvimento pós-seminal no cultivo *in vitro* e em condições de papel de filtro, observando-se que nesse tipo de plântula o cotilédone não se desprende do tegumento da semente, mantendo o haustório no interior dos restos seminais, como o observado em outros trabalhos com plântulas de bromélias (Pereira 1988, Scatena *et al* 2006, Pereira *et*

al. 2008). O padrão de desenvolvimento observado é o usualmente descrito para Bromeliaceae, como observado nos trabalhos de Pereira (1988), Scatena *et al.* (2006), Tillich (2007) e Pereira *et al.* (2008).

Em relação à descrição do desenvolvimento pós-seminal, as subfamílias Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae apresentam diferenças morfológicas marcantes entre si e peculiares aos gêneros. Para Tillandsioideae, a qual pertence *A. imperialis*, as principais características distintivas são a presença de bainha cotiledonar com tamanho mediano, o hipocótilo pouco desenvolvido e forte tendência da raiz primária ser reduzida ou ausente (Tillich 2007). Porém, no caso de *A. imperialis* uma espécie rupícola ou saxícola, a raiz primária já está presente aos 10 dias de idade, e em média a 20 dias já ocorre o aparecimento das raízes adventícias. Esse desenvolvimento das raízes ocorreu primeiro nas plântulas cultivadas *in vitro*, diferente do observado por Scatena *et al.* (2006) com espécies epífitas de *Tillandsia*, em que a estrutura que primeiro emergiu foi o cotilédone haustorial, sem haver o crescimento da raiz primária e as raízes adventícias tardiamente.

Uma vez estabelecidas às condições ótimas para a propagação da espécie, a partir de sementes, a técnica de produção de mudas por meio da micropropagação inclui as etapas de avaliação do crescimento *in vitro* e em condições de estufa, bem como da aclimatação. Embora seja considerado que o cultivo *in vitro* induza um crescimento maior em comparação ao cultivo em condições de estufa (Fay 1994, Engelmann 1997, Kozai *et al.* 1997, Thorpe & Harry 1997), não foram encontrados trabalhos que comparem esse aspecto ao longo do período de cultivo.

No presente estudo foi possível demonstrar que, a partir de 4 meses de cultivo as plantas mantidas *in vitro* diferenciavam-se muito daquelas mantidas em condições de estufa, principalmente no comprimento das raízes e das folhas.

A análise comparativa dos dados das plantas provenientes do cultivo *in vitro* e em condições de estufa mostrou um aumento dos valores dos dados biométricos e das massas das raízes ao longo do tempo. Embora os dois tipos de cultivos tenham sido mantidos nas mesmas condições de luminosidade e temperatura, no meio de cultura adicionou-se sacarose, já na solução de MS/2, utilizada para a adubação das plantas cultivadas em estufa, isso não ocorreu para evitar a proliferação de microorganismos, principalmente de fungos.

É reconhecido o importante papel da sacarose como componente do meio de cultura, servindo como fonte de carbono e energia para as plântulas, necessária para compensar a taxa fotossintética que, nessas condições, é prejudicada em função da restrição das trocas gasosas (Torres *et al.* 1998). Contudo, alguns autores atribuem função aos carboidratos diretamente relacionada ao desenvolvimento de órgãos (Calvete *et al.* 2002), como das raízes adventícias (Veierskov 1988, McCown 1988, Assis & Teixeira 1998, Grattapaglia & Machado 1998, Pasqual 2001, Aloufa 2003, Souza & Pereira 2007). Segundo Kozai (1991), a presença de carboidratos no meio de cultura é importante para o desenvolvimento das raízes, para a multiplicação dos brotos e, bem como, para o aumento da altura da planta, além disso, segundo Buchanan *et al.* (2002) e Taiz & Zeiger (2009) a presença de sacarose propicia o fornecimento de esqueletos carbônicos necessários à incorporação dos nutrientes.

A presença de raízes nas plantas cultivadas *in vitro* pode influenciar no sucesso de aclimatação. A intensificação da produção de raízes *in vitro* é frequentemente relacionada ao emprego de reguladores de crescimento como a auxina sintética, o AIB (ácido-indolilbutírico). Porém o uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo tem sido associado ao aparecimento de variações somaclonais (Joyce *et al.* 2003), indesejáveis quando se pretende uma uniformização da produção ou mesmo a manutenção do genótipo

original, isento de mutações, visando programas de conservação (Carneiro & Mansur 2004). Alternativamente ao uso dessas substâncias, tem sido demonstrado que o aumento da concentração de carboidratos, mais frequentemente a sacarose, adicionada ao meio de cultura, pode ser um fator determinante no sucesso da aclimação, por induzir o desenvolvimento do sistema radicular (Sorace *et al.* 2008). Plantas da orquídea *Oncidium baueri*, cultivadas *in vitro*, na presença de uma concentração maior de sacarose (40 g L⁻¹) que a de costume (30 g L⁻¹), apresentou melhor crescimento quando transferida para cultivo em casa de vegetação. Sorace *et al.* (2008), que trabalharam com essa espécie, associaram o maior desenvolvimento do sistema radicular ao sucesso na aclimação dessa orquídea. Calvete *et al.* (2002) observaram que plantas de morangueiro cultivadas *in vitro*, na ausência de sacarose, não apresentavam enraizamento e que a concentração de 45 g L⁻¹ foi a mais favorável ao aparecimento de raízes.

Dentre os carboidratos utilizados no preparo de meios de cultura, destaca-se a sacarose, pela praticidade e baixo custo (Grattapaglia & Machado 1998). Além disso, é o carboidrato mais comum da seiva do floema de muitas plantas (Murashige & Skoog 1962, Thorpe 1982, Lemos & Baker 1998, Fuentes *et al.* 2000).

Segundo Jang & Sheen (1994), o aumento do suprimento de sacarose para a planta favorece o aumento da capacidade de iniciação, crescimento e respiração de órgãos drenos, através do aumento da expressão de genes relacionados a esses processos.

De acordo com George e Sherrington (1984), concentrações elevadas de açúcar podem inibir a formação de raízes *in vitro*. Entretanto, efeitos satisfatórios ocorreram em experimento com porta-enxerto de pereira realizado por Leite *et al.* (2000), quando a sacarose foi utilizada no meio de cultura.

Segundo Faria *et al.* (2004), a concentração da sacarose influencia o crescimento e o acúmulo de biomassa (massa fresca) de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. propagadas

in vitro. Resultados semelhantes foram observados por Sorace *et al.* (2008), em que o uso de meio Murashige e Skoog (1962) com $\frac{1}{2}$ macronutrientes e com adição de 40 g L⁻¹ de sacarose promoveu o desenvolvimento vegetativo mais eficiente da orquídea *Oncidium baueri* Lindl., obtendo-se valores maiores tanto para o número como para o comprimento das raízes.

Outro aspecto que pode favorecer o crescimento das raízes nas condições *in vitro* é o estado físico do substrato. No cultivo *in vitro* o meio utilizado é semi-sólido, com o uso de ágar para dar consistência, interferindo positivamente na disponibilidade de água, nutrientes e outras substâncias para as plantas (Grattapaglia & Machado 1998). Diferentemente, o uso da casca de *Pinus* como substrato para as plantas cultivadas em condições de estufa, que além de apresentar outro estado físico, possui capacidade de retenção de água menor e maior porosidade, quando tal substrato é comparado com o meio de cultura gelificado, interferindo na disponibilidade de água, nutrientes e nos níveis de oxigênio para as plantas. Além disso, por não estar em condições assépticas, há competição pelos nutrientes com os microorganismos que podem estar no substrato.

Conforme Kämpf (1992), para o cultivo de bromélias epífitas o substrato deve ter baixa densidade, alta permeabilidade e aeração, além de presença de elevada fração de matéria orgânica para melhoria de suas propriedades. Dimmitt (1992), por sua vez, ressaltou que os substratos para as bromélias deveriam ser ácidos, com alta capacidade de campo, boa drenagem e aeração. Kanashiro *et al.* (2008) observaram que o uso da casca de *Pinus* pode ser utilizada como substrato para bromélia *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, em substituição ao xaxim, por ser o substrato que apresenta os melhores resultados para o crescimento da planta. Resultados semelhantes foram obtidos por Barbosa *et al.* (2008) para o crescimento de *Vriesea* 'Charlotte'.

No entanto, a bromélia imperial é considerada como de hábito rupícola ou saxícola, crescendo em afloramentos rochosos ou solos rasos e pedregosos (Paul 2006), cujas características físicas de permeabilidade e aeração são semelhantes à casca de *Pinus* e, dessa forma, a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, o uso de tal substrato para o cultivo dessa espécie se mostra viável.

Com relação à parte aérea, observou-se um aumento nos valores dos dados biométricos e das massas, tanto fresca como seca, ao longo do tempo, sendo maiores nas plantas *in vitro*. Como mencionado anteriormente, as plantas do cultivo *in vitro* foram mantidas em meio de cultura com adição de sacarose, importante fonte de energia, além de contribuir na estrutura de todos os compostos orgânicos (Murashige 1974, Pierik 1987, Caldas *et al.* 1990, Kozai 1990, Kozai 1991, Kozai *et al.* 1992, Zimmerman 1995, Kozai *et al.* 1997, Hartmann *et al.* 2002).

Outro aspecto que deve ser ressaltado, entre as diferenças do ambiente *in vitro* e nas condições de estufa, é o relacionado com as condições atmosféricas.

A propagação de plantas *in vitro* é um sistema asséptico de modo a evitar que fungos e outros organismos se desenvolvam no meio nutritivo. Com o intuito de proteger a cultura de contaminações e para prevenir a dessecação, tanto da planta quanto do meio de cultivo, as plantas são mantidas em frascos vedados, com restrição não intencional de trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco e o meio externo (Kozai *et al.* 1992, Mensuali-Sodi *et al.* 1992, Buddendorf-Joosten & Woltering 1994, Zimmerman 1995, Kozai *et al.* 1997, Pošpišilová *et al.* 1999).

É relatado que no interior dos frascos ocorrem altas concentrações especialmente de CO₂ e de outros gases (Kozai 1991, Buddendorf-Joosten & Woltering 1994, Kozai *et al.* 1997).

Nas condições de altas concentrações de CO₂ se observa, normalmente, um aumento da taxa fotossintética e, conseqüentemente, um aumento na porcentagem de clorofila, resultando em uma máxima eficiência fotoquímica do fotossistema 2 (Héloir & Fournioux, 2001; Luchesini *et al.*, 2001). Além disso, segundo Kozai (1991), a presença de carboidratos no meio de cultura promove a multiplicação dos brotos e o aumento da altura da planta.

Alguns trabalhos, inclusive, têm utilizado a aplicação de CO₂ no interior do frasco como forma de aumentar o crescimento das plantas (Kirdmanee *et al.* 1995, Fila *et al.* 2006).

Embora o crescimento das plantas cultivadas *in vitro* fosse significativamente maior, a análise anatômica mostrou que não houve diferenças em relação a morfologia dos estômatos e a distribuição dos tecidos que compõem o mesofilo. Quanto à estrutura a diferença observada foi na largura da lâmina foliar, sendo maior nas plantas cultivadas *in vitro*.

Vale salientar que nas condições *in vitro* é frequente a ocorrência de vitrificação ou hiperhidricidade (Pâques & Boxus 1987, Pâques 1991, Cuzzuol *et al.* 1995, Kevers *et al.* 2004, Saher *et al.* 2004, Chakrabarty *et al.* 2005), modificações nas células estomáticas (Marín *et al.* 1988, Blanke & Belcher 1989, Capellades *et al.* 1990, Sallanon *et al.* 1991, Sallanon *et al.* 1993, Tichá *et al.* 1999, Brutti *et al.* 2002, Apóstolo *et al.* 2005, Joshi *et al.* 2006), espessamento da cutícula e alterações nos tecidos que compõem o mesofilo (Apóstolo *et al.* 2005), pouco desenvolvimento do parênquima paliçádico (Noé & Bonini, 1996), diminuição da espessura do mesofilo (Calvete *et al.* 2002), progressiva diferenciação entre parênquima paliçádico e lacunoso (Pospíšilová *et al.* 1999). Tais aspectos, entretanto, não foram observados nas plantas micropropagadas de *A. imperialis*

estudadas, ou seja, a técnica de cultivo *in vitro*, sem o uso de reguladores, propiciou maior crescimento, sem alterar o padrão morfológico das plantas.

Segundo Vesco *et al.* (2000), em trabalho com 17 diferentes acessos de cultivares de *Ananas comosus* (L.) Merr. (abacaxizeiro) cultivados *in vitro*, a baixa taxa de variantes somaclonais observada demonstra uma estabilidade genotípica dessa espécie. Para a bromélia imperial propagada pelo cultivo *in vitro* sem o uso de reguladores, mesmo sendo a partir de sementes, não foram observadas variações morfológicas, demonstrando que esta espécie pode apresentar estabilidade genotípica, como os cultivares de abacaxizeiro.

Segundo Héloir & Fournioux (2001) e Luchesini *et al.* (2001), nas condições de altas concentrações de CO₂, normalmente presentes no cultivo *in vitro*, se observa um aumento da taxa fotossintética e, conseqüentemente, um aumento na porcentagem de clorofila, que leva a uma máxima eficiência fotoquímica do fotossistema 2.

A quantificação da clorofila é um método indireto de estimar a produtividade de uma planta. Bojović & Stojanović (2005) observaram que o conteúdo de clorofilas e carotenóides pode variar de acordo com a adubação. Portanto, o teor de clorofila pode ser usado para indicar condições de estresse ou de déficit nutricional (Argenta *et al.* 2001, Gáborčík 2003, Argenta *et al.* 2004).

Nas plantas cultivadas *in vitro*, os teores de clorofila podem variar dependendo da qualidade e quantidade da luz (Victório *et al.* 2007) e das formulações do meio de cultura (Tamaki *et al.* 2007, Santos 2009), já que as variações no conteúdo total de clorofila e carotenóides são bons indicadores do estresse em plantas.

A partir dos dados de teor de clorofila total (clorofila *a* + clorofila *b*) e da quantidade de água por planta, é possível calcular o índice de suculência (Kluge & Ting 1978). Quando se comparam os dados ao longo do período do trabalho, nota-se que os valores aumentam e que são maiores nas plantas cultivadas *in vitro*. Provavelmente, a

suculência esteja relacionada com a adaptação ao ambiente, já que essa característica é encontrada em plantas de ambiente xéricos ou sujeita a grandes variações de umidade.

Embora não seja uma característica obrigatória, a suculência das folhas normalmente está relacionada com o metabolismo fotossintético do ácido das crassuláceas (CAM) (Kluge & Ting 1978, Larcher 2006, Lambers *et al.* 2008).

As espécies consideradas CAM são comumente caracterizadas por possuírem folhas espessas, suculentas e que, em secção transversal, pode-se notar a presença de parênquima aquífero com várias camadas de células volumosas, com grande vacúolo e paredes finas (Kluge & Ting 1978, Nelson *et al.* 2005, Larcher 2006, Lambers *et al.* 2008).

Em Bromeliaceae, segundo Kluge & Ting (1978), cerca de 14 gêneros e mais de 50 espécies são reportadas como sendo CAM, enquanto Martin (1994) considera que 69% das bromélias epífitas são CAM.

Segundo Pierce *et al.* (2002), no caso da bromélia *Aechmea dactylina*, o metabolismo CAM é um modo relativamente eficiente de crescimento, dando vantagens ecofisiológicas se comparadas com plantas de metabolismo fotossintético C₃

O tecido de reserva de água pode funcionar como filtro de luz (Krulik 1980, Sipes & Ting 1985), transmitindo para o mesófilo apenas 70% da luz que incide na folha (Nishio & Ting 1993). A alta capacidade de armazenar água compensa os períodos de seca, que são muito comuns para espécies de hábito rupícola (Larcher 2006, Lambers *et al.* 2008, Helbsing *et al.* 2000).

Para a bromélia imperial, abordada no presente trabalho, que apresentam crescimento lento e suculência foliar, acredita-se que a espécie pode apresentar o metabolismo do ácido das crassuláceas (CAM), porém estudos específicos precisam ser realizados para tal confirmação.

Outro aspecto importante, na comparação do crescimento entre as plantas cultivadas *in vitro* e em condições de estufa ao longo do tempo, é conhecer em qual período ocorreu o maior incremento de biomassa nas plantas, contribuindo para determinar o intervalo de tempo em que ocorreu o maior crescimento. Para isso o cálculo da taxa de crescimento relativo (TCR) pode ser utilizado, já que o parâmetro de avaliação é considerado ao longo de um determinado período, estando diretamente relacionado ao valor no período anterior (Benincasa 2003).

Para o presente trabalho, foram calculadas taxas de crescimento relativo, tanto para as raízes como para a parte aérea, sendo que em geral, os maiores valores foram encontrados nas plantas cultivadas *in vitro* quando comparadas com aquelas, de mesma idade, em condição de estufa.

Nas taxas calculadas para os dados da parte aérea, os maiores valores obtidos foram para as plantas cultivadas *in vitro* com 2 meses de idade, com exceção para a taxa referente ao número de folhas mortas. Já para as plantas em condições de estufa, as maiores taxas de crescimento relativo foram observadas para plantas com 4 meses, indicando um atraso no crescimento quando comparadas com as plantas de cultivo *in vitro*.

A razão da massa foliar expressa a fração de matéria seca não exportada das folhas para o resto da planta (Benincasa 2003) e, sendo assim, os dados observados mostram um aumento na biomassa das folhas nas plantas cultivadas em estufa e um maior incremento em biomassa da parte aérea.

Nas plantas cultivadas *in vitro* a razão do número de folhas mortas foi superior, porém, nas plantas em condições de estufa o início do aparecimento de folhas mortas se deu em período anterior.

Os valores de taxa de crescimento relativo foram mais altos nas plantas cultivadas *in vitro* do que nas plantas em condições de estufa com a mesma idade. Para as taxas

calculadas para os dados das raízes, os maiores valores foram para as plantas com 2 meses de idade, tanto das cultivadas *in vitro* como as em condições de estufa, demonstrando que esse período é o que apresenta o maior incremento de biomassa das raízes.

Comparando-se os valores de TCR dos dados das raízes com os da parte aérea, pode-se dizer que as raízes se desenvolvem mais rápido que a parte aérea. Isso posto, fica claro que nas condições *in vitro* o crescimento além de ser maior é mais rápido.

A razão raiz:parte aérea foi maior nas plantas *in vitro*, acarretando um maior número de raízes e maior absorção de água e nutrientes, com conseqüente maior crescimento da planta.

A distribuição da biomassa calculada com base na massa seca das raízes e da parte aérea mostrou que para as raízes ocorre, ao longo do tempo, um aumento nos valores para as plantas cultivadas *in vitro* e uma diminuição para as plantas em condições de estufa. Já para os valores da parte aérea ocorreu uma inversão, sendo que para as plantas cultivadas *in vitro* houve uma diminuição e nas em condições de estufa um aumento nos valores.

Isso demonstra que as plantas mantidas em condições de estufa, talvez pelas limitações do substrato, investiram mais na biomassa da parte aérea. Ressalta-se, inclusive, que a espécie na natureza tem hábito rupícola ou saxícola, não apresentando sistema radicular profundo. As plantas mantidas *in vitro*, pela disponibilidade dos nutrientes e água, investiram tanto na parte aérea como nas raízes. Segundo Hartmann *et al.* (2002), plantas com raízes bem desenvolvidas são ideais para a aclimatação, sem a qual as plantas não resistem à transferência para condições *ex vitro*, condição em que dependem da taxa fotossintética e da capacidade de absorção de nutrientes do substrato para sua sobrevivência. Porém, plantas com muitas raízes dificultam a transferência em casos de subcultivos, aumentando o trabalho manual de realocação das plantas para novos meios de cultura, além de aumentar as possibilidades de contaminações.

Segundo Larcher (2006), plantas jovens em estágio de desenvolvimento crescem rapidamente tanto em extensão como em diâmetro. Conforme aumentam de tamanho, gradualmente assumem sua forma típica e alcançam o equilíbrio na razão parte aérea/parte subterrânea. Durante a fase principal de crescimento, as plantas estão no pico de suas atividades metabólicas (fotossíntese, respiração, absorção de substâncias minerais). Do ponto de vista da competição por espaço nas comunidades vegetais, o rápido crescimento nos primeiros estágios do desenvolvimento será decisivo para o futuro do indivíduo. É durante a fase vegetativa de crescimento que se manifestam as características da plasticidade fenotípica e, sobretudo, as adaptações modificativas em relação às condições do habitat.

Os resultados descritos anteriormente demonstram que a propagação de plantas de *A. imperialis*, a partir de sementes, através do cultivo *in vitro* é viável, e que não é necessário manter as plantas por mais de 6 meses, visto que a partir desse período já ocorre a morte das folhas, possivelmente indicando uma situação de estresse.

As etapas da micropropagação envolvem desde a escolha do explante, o estabelecimento da cultura, o acompanhamento do crescimento *in vitro* e a transferência das plantas das condições assépticas, com alta umidade e disponibilidade de nutrientes, para condições *ex vitro*, denominada de aclimação (Gratapaglia & Machado 1998). Nas condições de aclimação as plantas passam a depender da taxa fotossintética e da absorção de água e nutrientes do substrato (Gratapaglia & Machado 1998).

Segundo Hartmann *et al.* (2002), o período que as plantas permanecem em aclimação varia conforme a espécie, tipo de explante utilizado para iniciar o cultivo, condições da cultura, composição do meio de cultivo, uso de reguladores e outras substâncias, entre outros. Porém, a presença e o grau de desenvolvimento das raízes são fatores limitantes para o processo de aclimação, já que as plantas irão depender da

capacidade de absorção para sobreviver a essa nova condição. Por isso, torna-se importante realizar as avaliações biométricas antes e após o período de aclimação para garantir o crescimento das raízes.

O parâmetro utilizado para a escolha do momento da retirada das plantas dos frascos varia conforme a espécie estudada, a maioria dos autores citados anteriormente utilizava o comprimento da planta para selecionar os indivíduos para a aclimação, como Rech Filho *et al.* (2005), com *Vriesea reitzii*, que transferiram plantas com 2 cm para as condições *ex vitro*. Outros autores utilizam o tempo de cultivo *in vitro* como parâmetro para a retirada das plantas, no entanto, não mencionam suas dimensões (Mercier & Kerbauy 1992, Arrabal *et al.* 2002, Pickens *et al.* 2003, Silva *et al.* 2007). Diferentemente, no presente estudo, foram testados os efeitos de diferentes tempos de permanência das plantas no cultivo *in vitro* e na aclimação, a fim de determinar o tempo mínimo de cultivo *in vitro* que tenha sucesso na aclimação.

É importante salientar, que o índice de sobrevivência após 2 meses de aclimação observado no presente estudo foi superior a 96% para todos os períodos. Além disso, em todos os tratamentos (tempo de permanência no cultivo *in vitro*) utilizados não foram observadas variações morfológicas e alterações na pigmentação das folhas.

Muitos estudos têm sido realizados sobre a aclimação de bromélias produzidas a partir do cultivo *in vitro* (Mercier & Kerbauy 1992, Arrabal *et al.* 2002, Pickens *et al.* 2003, Rech Filho *et al.* 2005, Alves *et al.* 2006, Pickens *et al.* 2006, Silva *et al.* 2007). Em todos eles foram observadas altas taxas de sobrevivência ao período de aclimação, variando de 89% para espécie *Cryptanthus sinuosus* L.B. Sm. (Arrabal *et al.* 2002) a até 100% como em *Vriesea reitzii* Leme & Costa, Andrea (Rech Filho *et al.* 2005) e *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral (Silva *et al.* 2007).

No caso de bromélias, não foram encontrados na literatura artigos que levem em consideração o tempo ideal para as plantas permanecerem em aclimação. Alguns trabalhos citam períodos muito diferentes, que vão de 15 dias (Silva *et al.* 2007), 9 semanas (Rech Filho *et al.* 2005), 60 dias (Pickens *et al.* 2006) até 32 semanas (Pickens *et al.* 2003). Além disso, todos esses trabalhos usaram reguladores do crescimento, que afetam o desenvolvimento das plantas.

Além de estabelecer o período da aclimação, alguns trabalhos avaliaram a influência de diferentes substratos, como o de Pickens *et al.* (2003) que utilizaram quatro substratos, encontrando os melhores resultados para a aclimação de *Tillandsia eizii* L.B. Sm. utilizando casca de Pinus. A utilização desse substrato, para a referida espécie, não só obteve a melhor taxa de sobrevivência mas, também, o maior incremento em biomassa e altura das plantas.

Para a bromélia imperial foram testados diferentes substratos para a aclimação (Rodrigues *et al.* 2004), os melhores resultados foram observados para a combinação de 50% de terra e 50% de casca de arroz carbonizada, porém, é difícil uma padronização com uso de terra, já que podem possuir diferentes composições químicas. Para o presente estudo foi utilizada a casca de *Pinus*, por ser um substrato facilmente encontrado no comércio e já ter sido utilizado com sucesso para outras espécies de bromélias (Pickens *et al.* 2003, Kanashiro *et al.* 2008).

A análise comparativa dos dados das plantas da bromélia imperial, provenientes de diferentes tempos de permanência no cultivo *in vitro* e após 2 meses de aclimação em condições de estufa, mostrou um aumento dos valores dos dados biométricos ao longo do tempo.

Os dados das raízes apresentaram maiores valores nas plantas após a aclimação, mostrando que independente do tempo de cultivo *in vitro* ocorreu o crescimento das raízes durante a aclimação.

Já para os dados biométricos da parte aérea, o número de folhas sadias aumenta após a aclimação, nas plantas mais jovens cultivadas *in vitro*, porém após o período de 6 meses de cultivo *in vitro*, as plantas diminuem a quantidade de folhas sadias. O número de folhas mortas, após a aclimação, já ocorre em plantas com 2 meses de cultivo *in vitro*, provavelmente, a morte das folhas em plantas tão jovens foi causada pelo estresse da transferência de substrato.

Com relação aos dados de massa, tanto fresca como seca, das raízes e da parte aérea, aumentaram em todos os períodos após a aclimação, indicando que mesmo com a morte de algumas folhas, ocorreu o incremento da biomassa.

Os teores de pigmentos, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides, diminuíram após a aclimação, provavelmente em virtude de alterações na absorção dos nutrientes do substrato. Dados semelhantes foram citados por Pospíšilová *et al.* (1999) e Borghezan *et al.* (2003). Porém, Osório *et al.* (2005), depois da aclimação de plantas de *Ceratonia siliqua* L. (Fabaceae), observaram um aumento no conteúdo de clorofila total.

Para os valores de índice de suculência ocorre um aumento nas plantas aclimatadas se comparadas com os dados antes do período de aclimação. Esse fator pode indicar que as plantas aclimatadas armazenaram mais água durante e esse período, provavelmente esse acúmulo se deva a nova condição de umidade tanto do substrato quanto da atmosfera.

As taxas de crescimento relativo, tanto para os parâmetros calculados para as raízes como para a parte aérea, foram maiores nas plantas de 2 meses de cultivo *in vitro* após os 2 meses de aclimação. Plantas que permaneceram por mais tempo *in vitro* apresentam menores valores de taxa de crescimento relativo. Isso demonstra que as plantas mantidas

por um tempo prolongado nas condições de cultivo *in vitro* após o período de aclimação crescem, porém numa taxa muito baixa quando comparadas com as plantas que permaneceram um curto período nas condições *in vitro*. Tanto que a razão do número de folhas mortas foi maior nas plantas de 12 meses de cultivo *in vitro* após a aclimação.

As plantas cultivadas *in vitro* por 1 e 2 meses apresentaram os menores valores de biometria, porém em relação à taxa de crescimento relativo são as que mais apresentaram incremento após a aclimação. Segundo Skrebsky *et al.* (2004) e Sobrinho *et al.* (2007), quanto maior o tempo no cultivo *in vitro* menor a taxa de sobrevivência na aclimação.

A razão da massa foliar expressa a fração de matéria seca não exportada das folhas para o resto da planta, os dados observados mostraram um aumento na biomassa das folhas após o período de aclimação.

Já a razão raiz:parte aérea diminui nas plantas após a aclimação, demonstrando que após esse período o investimento em biomassa passou a ser para a parte aérea. Os dados da distribuição da biomassa mostram essa mudança no padrão de incremento, pois em todos os períodos estudados ocorreu a alteração da biomassa da raiz para a parte aérea.

O cultivo *in vitro* se mostrou, assim, eficiente e pode otimizar a produção da bromélia imperial, constatando-se que plantas com apenas 2 meses de cultivo *in vitro* já podem ser aclimatadas, contribuindo para uma diminuição no tempo de cultivo e na importante relação custo-benefício para sua produção comercial.

Sugere-se, pois, para conservação da espécie e de sua variabilidade genética, bem como para a produção de mudas para fins comerciais, que o protocolo adotado leve em consideração a utilização de sementes, a não aplicação de reguladores de crescimento nos diferentes tipos de cultivo, o tempo do cultivo *in vitro* - que deve ser de no mínimo 2 meses e não deve ultrapassar 6 meses, bem como a utilização de casca de *Pinus* como substrato e alta umidade relativa do ar na fase de aclimação, temperatura ambiente

próxima a 26°C e fotoperíodo de 12 horas nas três condições de cultivo, garantindo, assim, um alto índice de sobrevivência de plantas sem alterações morfológicas e um custo reduzido.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- É possível cultivar *Alcantarea imperialis* a partir de sementes por técnicas de cultivo *in vitro*.
- As plantas cultivadas *in vitro* são maiores e crescem mais rápido em relação as plantas de mesma idade cultivadas em condições de estufa.
- As plantas obtidas do cultivo *in vitro* não apresentam alterações morfológicas quando comparadas com plantas de mesma idade cultivadas em condições de estufa.
- O tempo de cultivo *in vitro* não deve ultrapassar 6 meses.
- As plantas com 2 meses de cultivo *in vitro* são as que apresentaram as maiores taxas de crescimento relativo após a fase de aclimatação.
- Sendo assim, para a produção da bromélia imperial, plantas com 2 meses de cultivo *in vitro* já podem ser aclimatadas, diminuindo a permanência no cultivo *in vitro* e consequentemente o custo da produção.

VII. RESUMO

O cultivo *in vitro* de bromélias tem sido considerado uma técnica eficiente para aperfeiçoar a propagação dessas plantas, que pelos métodos naturais não é capaz de fornecer em curto espaço de tempo, um grande número de espécimes, o que mais interessa ao produtor comercial. Para *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, utilizada no paisagismo e considerada ameaçada de extinção devido ao extrativismo ilegal, não existem relatos que comparem o crescimento *in vitro* com a produção em estufa. No cultivo *in vitro* as plantas são obtidas em condições controladas de assepsia, alta umidade e disponibilidade de nutrientes, enquanto que aos serem transferidas para crescimento *ex vitro* em estufa, a aclimatação, dependem da taxa fotossintética e da absorção de nutrientes do substrato. A redução do tempo de permanência *in vitro*, pode diminuir os custos de manutenção para os produtores. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo para a propagação de mudas da espécie *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms a partir de sementes, que permita obter o maior índice de produção e sobrevivência de plantas dessa espécie com o menor custo. Para o lote cultivado *in vitro*, as sementes após a retirada dos apêndices plumosos e desinfestação superficial foram depositadas em meio de cultura Murashige & Skoog (MS), com concentração original dos micronutrientes e metade da concentração dos macronutrientes (MS/2). Para o lote cultivado em estufa, sementes foram colocadas em gerbox com papel de filtro para a germinação. Após 30 dias da germinação, as plantas foram colocadas em bandejas de isopor contendo substrato de casca de *Pinus* moída, envoltas com plástico transparente para evitar a perda excessiva de umidade e adubadas semanalmente com solução de MS/2. Ambos os lotes foram mantidos em fotoperíodo de 12 h e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses de cultivo *in vitro*, 100 plantas correspondentes a cada período foram transferidas para condições *ex vitro* e mantidas por 2 meses em estufa nas mesmas condições de temperatura, luz e adubação utilizadas no cultivo *in vitro*. Os parâmetros avaliados, nos cultivos *in vitro* e em gerbox, foram taxa de germinação em diferentes fotoperíodos e desenvolvimento pós-seminal. As sementes são fotoblásticas positivas com porcentagem de germinação de 93% e o tempo médio de 4 dias. Não foram observadas diferenças morfológicas no desenvolvimento entre as plântulas cultivadas *in vitro* e em estufa. As plantas provenientes do cultivo *in vitro*, em estufa e as submetidas à aclimatação foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência, número e comprimento de folhas e raízes, teor de pigmentos, além do ganho de massas fresca e seca, índice de suculência, razão raiz:parte aérea, razão de peso de folha, distribuição de biomassa e taxa de crescimento relativo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste Tukey. Para a análise estrutural, amostras das folhas de plantas adultas incluídas em metacrilatoglicol foram seccionadas em micrótomo rotativo e as secções obtidas coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato 0,1M pH 4,7. Os resultados demonstraram que as plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentaram maiores valores para número e comprimento de raízes e folhas, principalmente a partir do 4º mês de cultivo, e ganho nas massas fresca e seca a partir do 6º mês de cultivo. As taxas de crescimento, tanto das raízes como da parte aérea, foram maiores nas plantas cultivadas *in vitro* com 2 meses. O teor de pigmentos, o índice de suculência e a razão raiz : parte aérea foram maiores nas plantas cultivadas *in vitro*, demonstrando que nessas plantas ocorre um aumento no investimento das raízes, enquanto que nas plantas cultivadas em estufa ele é maior para a parte aérea. O valor mínimo de sobrevivência das plantas cultivadas *in vitro* e transferidas para a aclimatação foi de 96% naquelas que permaneceram *in vitro* durante 4 meses. Os dados obtidos demonstram ser possível aclimatar plantas da espécie cultivadas *in vitro*, a partir de 2 meses, pois foi neste período que ocorreram as maiores taxas de crescimento e a

distribuição da biomassa apresentou dados similares entre as plantas cultivadas *in vitro* e as aclimatadas. Quanto à estrutura a diferença observada entre as plantas cultivadas *in vitro* e em estufa foi na largura da lâmina foliar, sendo maior nas primeiras, não foram observadas alterações nos diferentes tecidos foliares, inclusive nos estômatos. O cultivo *in vitro* se mostrou, assim, eficiente e pode otimizar a produção da bromélia imperial, constatando-se que plantas com apenas 2 meses de cultivo *in vitro* já podem ser aclimatadas, contribuindo para uma diminuição no tempo de cultivo e na importante relação custo-benefício para sua produção comercial.

Palavras chave: Bromeliaceae, anatomia, micropropagação

VIII. ABSTRACT

The culture *in vitro* of bromeliads has been considered an efficient technique to improve the production of such plants. The natural methods for dissemination of bromeliads are unable to produce a great number of plants in a short period of time which is an interesting characteristic for commercial producers. The imperial bromeliad, *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, is used in landscaping and is considered under risk of extinction due to illegal exploitation. Information concerning the *in vitro* growth of this species compared to plants cultivated in greenhouse it is not available to date. The *in vitro* culture was obtained under aseptic and high humidity conditions and availability of nutrients, being transferred for *ex vitro* condition in greenhouse (acclimatization stage). During this phase the survival of plants depends on the photosynthetic rate and the absorption of nutrients from the substrate. The reduction of the *in vitro* culture period may contribute for the reduction of the production costs. The aim of this work was to establish a protocol to propagate *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, starting from the seeds, that allows to obtain the best rate of production with the lowest cost. For *in vitro* culture lot, after the removal of the plumous appendices, the seeds were superficially disinfested, and placed in Murashige & Skoog (MS) culture medium with original micronutrients concentrations and half concentration of the macronutrients (MS/2). For the greenhouse culture lot, seeds were germinated in Gerbox with two layers of filter paper. After 30 days of germination, the plantlets were transferred to polystyrene trays containing *Pinus* bark as substrate, covered with transparent plastic to avoid the excessive water loss and weekly fertilized with MS/2 solution. Both lots of plants were maintained at 12h-photoperiod and $26 \pm 2^\circ\text{C}$. After 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months of *in vitro* culture, 100 plants from each period were transferred for *ex vitro* conditions and maintained for 2 months in a greenhouse under the same conditions of temperature, light and fertilization. The germination percentage in different photoperiods and the post seminal development were analyzed in plants cultured *in vitro*, greenhouse and acclimatization conditions. The seeds are photoblastic positive, with 93% of germination index in an average period of 4 days. There was not any morphological difference between plantlets originated from *in vitro* and greenhouse conditions. The plantlets from the different treatments were evaluated concerning the survival percentage, number and length of leaves and the roots, concentration of pigments, fresh and dry masses, succulence index, roots : aerial portion rate, leaf weight, biomass distribution and relative growth index. The data were submitted to Tukey test. For the structural analysis samples of adult leaves were embedded in glycol metacrylate medium, sectioned in rotative microtome and the sections stained with 0.05% tolluidine blue in 0.1M pH 4.7 acetate buffer. The results demonstrate that plants from *in vitro* culture present the greatest number and length of roots and leaves, especially from the 4th month and the greatest fresh and dried masses from the 6th month. The growing index for root and leaves were greater *in vitro* in plants with two-months old. The concentration of pigments, succulence index, roots reason: aerial portion were greater in plants cultivated *in vitro*, indicating an increased root investment, while in plants from the greenhouse the investment was higher in the aerial portion. The minimum survival value (96%) was obtained for plants cultivated for 4 months *in vitro* before transferring to acclimatization chambers. The obtained data show that it is possible to obtain healthy plants from two-month old *in vitro* culture, because during this period there was observed the highest biomass rate and the biomass distribution of *in vitro* grown plants was similar to that of acclimatized plants. Concerning the structural aspects analyzed the only difference observed was that plants from *in vitro* culture presented more width leaves than those from

acclimatized plants. The *in vitro* culture was more efficient and could optimize the imperial bromeliad production, with a special recommendation for the use of two-month old cultured plants *in vitro* before acclimatization. This procedure could contribute to the decrease of the culture period and the reduction of the costs for the commercial production of the imperial bromeliad.

Key words: Bromeliaceae, anatomy, micropropagation

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AboEl-Nil, M.M.** 1997. Tissue culture of native plants in the developing countries. *Acta Horticulturae* 447: 507-513.
- Adams III, W.W. & Martin, C.E.** 1986a. Heterophylly and its relevance to evolution within the Tillandsioideae. *Selbyana* 9: 121-125.
- Adams III, W.W. & Martin, C.E.** 1986b. Morphological changes accompanying the transition from juvenile (atmospheric) to adult (tank) forms in the Mexican epiphyte *Tillandsia deppeana* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 73: 1207-1214.
- Ahuja, M.R.** 1993. Micropropagation *à la carte*. In: M.R. Ahuja (ed.) Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 3-9.
- Aloufa, M.A.I.** 2003. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: 14º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 1º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras, p. 3-5.
- Alves, G.M., Vesco, L.L.D. & Guerra, M.P.** 2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae* 110: 204-207.
- Andrade, F.S.A. & Demattê, M.E.S.P.** 1999. Estudo sobre produção e comercialização de bromélias nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 5: 97-110.
- APG III.** 2009. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-202.
- Apóstolo, N.M., Brutti, C.B. & Llorente, B.E.** 2005. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41: 307-313.

- Argenta, G., Silva, P.R.F. & Bortolini, C.G.** 2001. Clorofila na folha como indicador do nível de nitrogênio em cereais. *Ciência Rural* 31: 715-722.
- Argenta, G., Silva, P.R.F. & Sangoi, L.** 2004. Leaf relative chlorophyll content as an indicator parameter to predict nitrogen fertilization in maize. *Ciência Rural* 34: 1379-1387.
- Arrabal, R., Amancio, F., Carneiro, L.A., Neves, L.J. & Mansur, E.** 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation* 11: 1081-1089.
- Arruda, R.C.O. & Costa, A.F.** 2003. Foliar anatomy of Five *Vriesea* sect. *Xiphion* (Bromeliaceae) species. *Selbyana* 24: 180-189.
- Assis, T.F. & Teixeira, S.L.** 1998. Enraizamento de plantas lenhosas. In: A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, Brasília, v.1, pp. 261-296.
- Bandyopadhyay, T., Gangopadhyay, Poddar, R. & Mukherjee, K.K.** 2004. Trichomes: their diversity, distribution and density in acclimatization of teak (*Tectona grandis* L.) plants grown *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 113-121.
- Bárbara, T., Martinelli, G., Fay, M.F., Mayo, S.J. & Lexer, C.** 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16: 1981-1992.
- Bárbara, T., Martinelli, G., Palma-Silva, C., Fay, M.F., Mayo, S.J. & Lexer, C.** 2009. Genetic relationship and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcantarea glaziouna*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65-77.

- Barbosa, G.C.V., Grossi, J.A.S., Paula, C.C., Santos, N.T., Barbosa, J.G., Mesquita, E.R., Zuin, A.H.L., Lana, L.D., Matos, M. & Barbosa, J.C.V.** 2008. Uso de diferentes substratos no cultivo da bromélia *Vriesea* 'Charlotte'. *In: VI Encontro Nacional sobre substratos para plantas*, Fortaleza.
- Barboza, S.B.S.C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J.B., Portes, T.A. & Souza, L.A.C.** 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 185-194.
- Barfuss, M.H.J., Samuel, R., Till, W. & Stuessy, T.F.** 2005. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany* 92: 337-351.
- Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Vasquez, N. & Etienne, H.** 2002. Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: Morphological, mineral and water characteristics. *Annals of Botany* 90: 77-85.
- Benincasa, M.M.P.** 2003. Análise de Crescimento de Plantas. Funep, Jaboticabal.
- Bennett, B.C.** 2000. Ethnobotany of Bromeliaceae. *In: D.H. Benzing* (ed.). *Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation*. Cambridge University, Cambridge, pp. 587-608.
- Benzing, D.H.** 1976. Bromeliad trichomes: structure, function, and ecological significance. *Selbyana* 1: 330-348.
- Benzing, D.H.** 1980. *The Biology of the Bromeliaceae*. Mad River Press, California.
- Benzing, D.H.** 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Benzing, D.H. & Burt, K.M.** 1970. Foliar permeability among twenty species of the Bromeliaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 97: 269-279.

- Benzing, D.H. & Renfrow, A.** 1971. The significance of photosynthetic efficiency to habitat preference and phylogeny among Tillandsioid bromeliads. *Botanical Gazette* 132: 19-30.
- Benzing, D.H., Henderson, K., Kessel, B. & Sulak, J.** 1976. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *American Journal of Botany* 63: 1009-1014.
- Benzing, D.H., Seemann, J. & Renfrow, A.** 1978. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. *American Journal of Botany* 65: 359-365.
- Bert, T.M.** 2007. Growing *Alcantarea*. *Journal of Bromeliad Society* 57:218-221.
- Bewley, J.D. & Black, M.** 1994. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York.
- Billings, F.H.** 1904. A study of *Tillandsia usneoides*. *Botanical Gazette* 38: 99-121.
- Biodiversitas.** 2007. Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/grupo3fim.asp> (acesso em 01.03.2007).
- Blanke, M.M. & Belcher, A.R.** 1989. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 85-89.
- Bobrowski, R., Biondi, D. & Baggenstoss, D.** 2009. Composição de canteiros na arborização de ruas de Curitiba (PR). *Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana* 1: 44-61.
- Bojović, B. & Stojanović, J.** 2005. Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Archives of Biological Science* 57: 283-290.
- Borges, E.E.L. & Rena, A.B.** 1993. Germinação de sementes. *In*: I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia (eds.). *Sementes florestais tropicais*. Abrates, Brasília, PP. 83-135.

- Borghezan, M., Moraes, L.K.A., Moreira, F.M. & Silva, A.L.** 2003. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 783-789.
- Braga, M.M.N.** 1977. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. *Acta Amazonica* 7:1-74.
- Brighigna, L., Fiordi, A.C. & Palandri, M.R.** 1984. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. *Phytomorphology* 34: 191-200.
- Brown, G.K. & Gilmartin, A.J.** 1989. Stigma type in Bromeliaceae – A systematic survey. *Systematic Botany* 14: 110-132.
- Brutti, C. B., Rubio, E.J., Llorente, B.E. & Apóstolo, N.M.** 2002. Artichoke leaf morphology and surface features in different micropropagation stages. *Biologia Plantarum* 45: 197-204.
- Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R.** 2002. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Buddendorf-Joosten, J.M.C. & Woltering, E.J.** 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 15: 1-16.
- Bukatsch, F.** 1972. Bemerkungen zum Doppelfarbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.
- Caldas, L.S., Haridasan, P. & Ferreira, M.E.** 1990. Meios Nutritivos. *In*: A.C. Torres, L.S. Caldas, J.A. Buso (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, Brasília, v.1, pp. 37-70.
- Calvete, E.O., Azevedo, M., Bordignon, M.H. & Suzin, M.** 2002. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. *Horticultura Brasileira* 20: 649-653.

- Camargo, F.C.** 1943. Vida e utilidade das Bromeliáceas. Boletim Técnico 1: 3-31.
- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C. & Debergh, P.** 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. Journal of the American Society for Horticultural Science 115: 141-145.
- Carneiro, L.A. & Mansur, E.** 2004. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. Vidalia 2: 12-20.
- Carvalho, V.L.** 1997. Bromélias na Serra. Bromélia 4: 10-11.
- Castro, R.D., Bradford, K.J. & Hilhorst, H.W.M.** 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In*: A.G. Ferreira & F. Borghetti (orgs.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed Editora, Porto Alegre, pp. 149-162.
- Chakrabarty, D., Park, S.Y., Ali, M.B., Shin, K.S. & Paek, K.Y.** 2005. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. Tree Physiology 26: 377-388.
- Chan, B.K., Peterson, A.L. & Farmer, C.G.** 2007. *Dendrobates auratus* (green and black poison dart frog). Larval predation. Herpetological Review 38: 321-322.
- Christie, C.B. & Brascamp, W.** 1989. Exflasking high health *Daphne odora* plantlets. Combined Proceedings - International Plant Propagators Society 38: 394-398.
- Chu, E.P., Tavares, A.R., Kanashiro, S., Giampaoli, P. & Yokota, E.S.** 2010. Effects of auxins on soluble carbohydrates, starch and soluble protein content in *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. Scientia Horticulturae 125: 451-455.
- Corsato, C.E. & Crocomo, O.J.** 2002. Aclimação de plantas de morangueiro *in vitro* em presença de fungos endomicorrízicos. UNIMONTES Científica 3: 1-15.
- Crayn, D. M.; Randall, G. T., Smith., J. A. C. & Winter, K.** 2000. Molecular systematic investigations in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) as a basis for understanding the evolution of crassulacean acid metabolism (CAM). *In*: K. L. Winter & D. A.

- Morrison (eds.). Monocots: systematic and evolution. CSIRO Publishing, Melbourne. Pp. 569-579.
- Crayn, D.M., Winter, K. & Smith, J.A.C.** 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 3703-3708.
- Cuzzuol, G.R.F., Gallo, L.A., Almeida, M. & Crocomo, O.J.** 1995. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. Scientia Agricola 52: 604-614.
- Davidson, S.E. & Donnan, A.** 1977. *In vitro* propagation of *Cryptanthus* spp. Proceedings Florida State Horticultural Society 90: 303-304.
- Debergh, P.C.** 1991. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. Acta Horticulturae 289: 291-300.
- Debergh, P.C.** 1994. *In vitro* culture of Ornamentals. In: I.K. Vasil & T.A. Thorpe (eds.) Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 561-573.
- Debergh, P.C. & Maene, L.J.** 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae 14: 335-345.
- De Paula, S.M., Tamki, V., Nievola, C.C. & Kanashiro, S.** 2006. Crescimento das bromélias ornamentais *Acanthostachys strobilaceae* (Schultes f.) Klotzsch, *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Beker e *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes adubações em casa de vegetação. In: Anais do XVI Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Unimep, Piracicaba.
- Desjardins, Y., Gosselin, A. & Yelle, S.** 1987. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. Journal of the American Society for Horticultural Science 112: 846-851.

- Devi, Y.S., Mujib, A. & Kundu, S.C.** 1997. Efficient regenerative potential from long term culture of pineapple. *Phytomorphology* 47: 255-259.
- Dhawan, V. & Bhojwani, S.S.** 1987. Hardening *in vitro* and morpho-physiological changes in the leaves during acclimatization of micropropagated plants of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Plant Science* 53: 65-72.
- Dimmitt, M.A.** 1992. Bromeliads: a cultural manual. The Bromeliad Society, Oregon.
- Donnelly, D.J. & Tisdall, L.** 1993. Acclimatization strategies for micropropagated plants. *In: M.R. Ahuja (ed.). Micropropagation of woody plants.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.153-166.
- Downs, R.J.** 1964. Photocontrol of germination of seeds of the Bromeliaceae. *Phyton* 21: 1-6.
- Droste, A., Silva, A.M., Matos, A.V. & Almeida, J.W.** 2005. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 717-722.
- Drummond, J. A.** 1997. Devastação e Preservação Ambiental: os Parques Nacionais do Estado do Rio de Janeiro. EdUFF, Rio de Janeiro.
- Endres, L. & Mercier, H.** 2001. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. *Journal of Plant Physiology* 158: 205-212.
- Endres, L., Souza, B.M. & Mercier, H.** 2002. *In vitro* nitrogen nutrition and hormonal pattern in bromeliads. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38: 481-486.
- Engel, V.L. & Poggiani, F.** 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de 4 espécies florestais nativas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 3: 39-45.
- Engelmann, F.** 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57: 227-243.

- Engelmann, F.** 1997. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. *Acta Horticulturae* 447: 471-475.
- Falk, D.A.** 1990. Intergrated strategies for conserving plant genetic diversity. *Annual Missouri Botanical Garden* 77: 38-47.
- Faria, R.T., Rodrigues, F.N., Oliveira, L.V.R. & Müller, C.** 2004. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira* 22: 780-783.
- Fay, M.F.** 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In *Vitro Cellular Development Biology* 28: 1-4.
- Fay, M.F.** 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3: 176-183.
- Feder, N. & O'Brien, T.P.** 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55: 123-142.
- Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A. & Rates, S.M.K.** 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42: 369-394.
- Fila, G., Ghashghaie, J., Hoarau, J. & Cornic, G.** 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. *Physiologia Plantarum* 102: 411-418.
- Fila, G., Badeck, F.-W., Meyer, S., Cerovic, Z. & Ghashghaie, J.** 2006. Relationships between leaf conductance to CO₂ diffusion and photosynthesis in micropropagated grapevine plants, before and after *ex vitro* acclimatization. *Journal of Experimental Botany* 57: 2687-2695.
- Fiorato, L.** 2009. O gênero *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) no estado da Bahia, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.

- Flores, E.M.** 1975. Algunos aspectos de anatomía foliar comparada de dos especies de Bromeliaceae (*Aechmea mexicana* Baker y *Hechtia glomerata* Zucc.). *Revista de Biología Tropical* 23: 29-52.
- Frank, J.H. & Lounibos, L.P.** 2009. Insects and allies associated with bromeliads: a review. *Terrestrial Arthropod Reviews* 1: 125-153.
- Fuentes, S.R.L., Calheiros, M.B.P., Manetti-Filho, J. & Vieira, L.G.E.** 2000. The effect of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canphora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 5-13.
- Gáborčík, N.** 2003. Relationships between contents of chlorophyll (*a + b*) (*SPAD* values) and nitrogen of some temperate grasses. *Photosynthetica* 41: 285-287.
- García-Suárez, M.D., Rico-Gray, V., Molina-Aceves, N. & Serrano, H.** 2006. *In vitro* germination and clonal propagation of endemic *Tillandsia califanii* Rauh (Bromeliaceae) from México. *Selbyana* 27: 54-59.
- Garwood, N.C.** 1996. Functional morphology of tropical tree seedlings. *In*: M.D. Swaine (ed.). *The ecology of tropical forest tree seedling*. Man and the Biosphere series, Paris, pp. 59-129.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. & Dommes, J.** 2002. Concepts in plant stress physiology: application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263-285.
- George, E.F. & Sherrington, P.D.** 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics, Eversley.
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Evans, T.M., Hall, J.C., Pires, J.C., Berry, P.E. & Systma, K.J.** 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions *in* Rapateaceae and

- Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. International Journal of Plant Science 165: S35-S54.
- Givnish, T.J., Millan, K.C., Berry, P.E. & Systma, K.J.** 2007. Phylogeny, adaptive radiations and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. In: J.T. Columbus, E.A. Friar, J.M. Porter, L.M. Prince & M.G. Simpson (eds.). Monocots: Comparative Biology and Evolution – Poales. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, pp. 3-26.
- Gómez, M.A. & Winkler, S.** 1991. Bromelias en manglares del Pacífico da Guatemala. Revista de Biología Tropical 39: 207-214.
- González-Olmedo, J.L., Fundora, Z., Molina, L.A., Abdalnour, J., Desjardins, Y. & Escalona, M.** 2005. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) in temporary immersion bioreactors. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 41: 87-90.
- Graeff, O.R. & Pagani, Y.V.** 1996. A associação fogo-capim gordura e o desaparecimento de *Alcantarea imperialis*. Bromélia 3: 13-15.
- Grant, J.R.** 1995a. The resurrection of *Alcantarea* and *Werauhia*, a new genus. Abh. Akademie der Wissenschaften und der Literatur Mainz Math.-Naturwiss. Klasse, Tropische und subtropische Pflanzenwelt 91: 7-15.
- Grant, J.R.** 1995b. Sinopse do gênero *Alcantarea*. Bromélia 2: 24-26.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A.** 1998. Micropropagação. In: A.C. Torres, L.S. Caldas, J.A. Buso (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, Brasília, v.1, pp. 43-76.
- Grout, M.C. & Millan, S.** 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Annals of Botany 55: 129-131.

- Guerra, M.P., Vesco, L.L.D., Pescador, R., Schuelter, A.R. & Nodari, R.O.** 1999. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1557-1563.
- Gurevitch, J., Scheiner, S.M. & Fox, G.A.** 2009. *Ecologia Vegetal*. 2 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Jr., F.T. & Geneve, R.L.** 2002. *Plant Propagation: principles and practices*. 7 ed. Upper Saddle River, New Jersey.
- Hazarika, B.N.** 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85:1704-1712.
- Helbsing, S., Riederer, M. & Zotz, G.** 2000. Cuticles of vascular epiphytes: efficient barriers for water loss after stomatal closure? *Annals of Botany* 86: 765-769.
- Héloir, M.C. & Fournioux, J.C.** 2001. Morphogenèse de la vigne *in vitro* sous atmosphère enrichie en gaz carbonique: importance de l'antériorité morphogénétique des microboutures et du nombre de subcultures. *Canadian Journal of Botany* 79: 1129-1133.
- Hildebrandt, V. & Harney, P.M.** 1983. *In vitro* propagation of *Syringa vulgaris* "Vesper". *HortScience* 18: 432-434.
- Hoehne, F.C.** 1939. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo.
- Hoffmann, W.A. & Poorter, H.** 2002. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Annals of Botany* 80: 37-42.
- Horres, R., Zizka, G., Kahl, G. & Weising, K.** 2000. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from *trnL* (UAA) intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biology* 2: 306-315.

- Hosoki, T. & Asahira, T.** 1980. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. HortScience 15: 603-604.
- Hunt, R., Causton, D.R., Shipley, B. & Askew, P.** 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. Annals of Botany 90: 485-488.
- Ibama.** 1989. Unidades de Conservação do Brasil. Parques Nacionais e Reservas Biológicas, Brasília. v. 1.
- Jacques-Félix, H.** 2000. The Discovery of a Bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. Selbyana 21: 118-124.
- Jang, J.C. & Sheen, J.** 1994. Sugar sensing in higher plants. The Plant Cell 6: 1665-1679.
- Johansen, D.A.** 1940. Plant Microtechnique. Mc Graw Hill, New York.
- Jones, J.B. & Murashige, T.** 1974. Tissue culture propagation of *Aechmea fasciata* Baker and other bromeliads. International Plant Propagators Society Combined Proceedings 24: 117-127.
- Joshi, P., Joshi, N. & Purohit, S.D.** 2006. Stomatal characteristics during micropropagation of *Wrightia tomentosa*. Biologia Plantarum 50: 275-278.
- Joyce, S.M., Cassells, A.C. & Jain, S.M.** 2003. Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 103-121.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. & Stevens, P.F.** 1999. Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D., Čapková, V. & Schäfer, C.** 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. Plant Science 161: 695-701.
- Kämpf, A.N.** 1992. Bromélias. In: C.E.F. Castro, B.L.D. Angelis, L.P.P. Moura, R.B.A. Silveira, G. Angelis Neto & N.T. Sato (coord.). Manual de floricultura. UEM, Maringá, pp. 201-211.

- Kanashiro, S., Minami, K., Jocys, T., Dias, C.T.S. & Tavares, A.R.** 2008. Substratos alternativos ao xaxim na produção de bromélia ornamental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 1319-1324.
- Karp, A.** 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302.
- Kevers, C., Franck, T., Strasser, R.J., Dommès, J. & Gaspar, T.** 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181-191.
- Kirdmanee, C., Kitaya, Y. & Kozai, T.** 1995. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*: anatomical comparisons. *Acta Horticulturae* 393: 111-118.
- Kiss, E., Kiss, J., Gyulai, G. & Heszky, L.E.** 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience* 30: 127-129.
- Kiyuna, I., Francisco, V.L.F., Coelho, P.J., Caser, D.V., Assumpção, R. & Ângelo, J.A.** 2004. Floricultura brasileira no início do século XXI: o perfil do produtor. *Informações Econômicas* 34: 14-32.
- Kluge, M. & Ting, I.P.** 1978. *Crassulacean Acid Metabolism: Analysis of an Ecological Adaptation*. Springer-Verlag, Berlin.
- Knudson, L.** 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 14: 214-217.
- Kozai, T.** 1990. Micropropagation under photoautotrophic conditions. *In: P.Debergh & R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation: technology and application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 449-471.
- Kozai, T.** 1991. Photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 27: 47-51.

- Kozai, T., Fujiwara, K., Hayashi, M. & Aitken-Christie, J.** 1992. The *in vitro* environment and its control in micropropagation. *In*: K. Kurata & T. Kozai (eds.). Transplant Production Systems. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 247-282.
- Kozai, T., Kubota, C. & Jeong, B.R.** 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 49-56.
- Krauss, B.H.** 1948. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. I – Introduction, organography, the stem, and the lateral branch or axillary buds. *Botanical Gazette* 110: 159-217.
- Krauss, B.H.** 1949a. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. II – The leaf. *Botanical Gazette* 110: 333-404.
- Krauss, B.H.** 1949b. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. III – The root and the cork. *Botanical Gazette* 110: 550-587.
- Krulik, G.A.** 1980. Light transmission in window-leaved plants. *Canadian Journal of Botany* 58: 1591-1600.
- Kuksova, V.B., Piven, N.M. & Gleba, Y.Y.** 1997. Somaclonal variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 17-27.
- Kurita, F.M.K.** 2008. Crescimento *in vitro* da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Braz Cubas, Mogi das Cruzes.
- Labouriau, L.G.** 1983. A germinação das sementes. OEA, Washington.
- Lambers, H., Chapin III, F.S. & Pons, T.L.** 2008. *Plant physiological ecology*. 2 ed. Springer, New York.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia Vegetal*. 3 ed. RiMa Artes e Textos, São Carlos.

- Leite, G.B., Finardi, N. & Fortes, G.R.L.** 2000. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OHXF97. *Ciência & Agrotecnologia* 24: 353-357.
- Leme, E.M.C.** 1994. Bromélia da capa: *Vriesea imperialis*. *Bromélia* 1: 9-10.
- Leme, E.M.C.** 1997a. *Canistrum*: Bromélias da Mata Atlântica. Salamandra, Rio de Janeiro.
- Leme, E.M.C.** 1997b. Contribuição ao estudo do gênero *Alcantarea* – II. *Bromélia* 4: 29-40.
- Leme, E.M.C. & Marigo, L.C.** 1983. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda., Rio de Janeiro.
- Leme, E.M.C. & Siqueira Filho, J.A.** 2006. Taxonomia das bromélias dos fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas. *In*: J.A. Siqueira Filho & E.M.C. Leme (eds.). Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste – Biodiversidade, Conservação e suas Bromélias. Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro, pp. 191-381.
- Lemos, E.E.P. & Baker, D.A.** 1998. Shoot regeneration in response to carbon source on intermodal explants of *Annona muricata* L. *Plant Growth Regulation* 25: 105-112.
- Lichtenthaler, H.K.** 1987 Chlorophylls and Carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* 148: 350-382.
- Lobo, G.M.** 2007. Morfoanatomia da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.
- Lorenzi, H. & Matos, F.J.A.** 2008. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M.** 1999. Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

- Louro, R.P., Santiago, L.J.M., Machado, R.D. & Santos, A.V.** 2003. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* plants cultivated *ex vitro* greenhouse and field conditions. *Trees, Structures and Functions* 7: 11-22.
- Lucchesini, M., Mensuali-Sodi, A., Massai, R. & Gucci, R.** 2001. Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. *Biologia Plantarum* 44: 167-174.
- Luther, H.E.** 1994. Aspectos do cultivo e da conservação de bromélias. *Bromélia* 1: 3-6.
- Luther, H. E.** 2008. An alphabetical list of Bromeliad Binomials, 11th ed. The Bromeliad Society International, Sarasota.
- Mace, G.M. & Hudson, E.J.** 1999. Attitudes toward sustainability and extinction. *Conservation Biology* 13: 242-246.
- Maciel, A.L.R., Silva, A.B. & Pasqual, M.** 2000. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. *Ciência & Agrotecnologia* 24: 9-12.
- Magalhães, A.C.N.** 1979. Análise quantitativa do crescimento. *In*: M.G. Ferri (coord.) *Fisiologia Vegetal*. EPU/EDUSP, São Paulo, pp. 331-350.
- Majada, J.P., Tadeo, F., Fal, M.A. & Sánchez-Tamés, R.** 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 207-214.
- Manetti, L.M., Delaporte, R.H. & Laverde Jr., A.** 2009. Metabólitos secundários da Família Bromeliaceae. *Química Nova* 32: 1885-1897.
- Mantovani, A. & Iglesias, R.R.** 2005. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. *Rodriguésia* 56: 73-84.

- Mapes, O.M.** 1973. Tissue culture of bromeliads. International Plant Propagators Society Combined Proceedings 23: 47-55.
- Marín, J.A., Gella, R. & Herrero, M.** 1988. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. Annals of Botany 62: 663-670.
- Martin, C.E.** 1994. Physiological ecology of the Bromeliaceae. Botanical Review 60: 1-82.
- Martinelli, G.** 1997. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: H.C. Lima & R.R. Guedes-Bruni (eds.) Serra de Macaé de Cima: Diversidade Florística e Conservação em Mata Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 213-250.
- Martinelli, G. & Vaz, A.M.S.F.** 1988. Padrões fitogeográficos em Bromeliaceae dos campos de altitude da floresta pluvial tropical costeira do Brasil, no Estado do Rio de Janeiro. Rodriguésia 64/66: 3-10.
- Mathews, V.H. & Rangan, T.S.** 1979. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explants *in vitro* cultures of pineapple. Scientia Horticulturae 11: 319-328.
- Mathews, V.H. & Rangan, T.S.** 1981. Growth and regeneration of plantlets in callus cultures of pineapple. Scientia Horticulturae 14: 227-234.
- Maun, M.A.** 1994. Adaptations enhancing survival and establishment of seedlings on coastal dune systems. Vegetation 111: 59-70.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A.** 1982. The germination of seeds. 3 ed. Pergamon Press, Oxford.
- McCoww, B.H.** 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: T.D. Davis, B.E. Haissig & N. Sankhla (eds.). Adventitious root formation in cuttings. Dioscorides Press, Portland, v.2, pp. 289-302.

- Medina, J.C.** 1959. Plantas fibrosas da Flora Mundial. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.
- Melo, T.B.** 1996. As bromélias no paisagismo. *Bromélia* 3: 3-7.
- Menescal, R.** 1994. Reprodução de bromélias por sementes. *Bromélia* 1: 8-10.
- Menescal, R.** 1996. Cultivando bromélias – reprodução por brotos. *Bromélia* 3: 26-28.
- Mensuali-Sodi, A., Panizza, M. & Tognoni, F.** 1992. Quantification of ethylene losses in different container-seal systems and comparison of biotic and abiotic contributions to ethylene accumulation in cultured tissues. *Physiologia Plantarum* 84: 472-476.
- Mercier, H. & Guerreiro Filho, O.** 1990. Propagação sexuada de algumas bromélias nativas da Mata Atlântica: efeito da luz e da temperatura na germinação. *Hoehnea* 17: 19-26.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1992. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 247-249.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1994. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of the Bromeliad Society* 44: 120-124.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1995. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana* 16: 147-149.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). *Biotechnology in Agricultura and Forestry* 40: 43-57.
- Mercier, H. & Nievola, C. C.** 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1: 57-62.
- Mollo, L.** 2009. Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na composição de carboidratos não estruturais de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms

- (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Mosti, S. Raffaelli, L. & Brighigna, L.** 2005. The *Tillandsia* trichome (Bromeliaceae) and its use in species identification. *Webbia* 60:577-598.
- Mothé, C.G. & Araújo, C.R.** 2004. Caracterização térmica e mecânica de compósitos de poliuretano com fibras de curauá. *Ciência e Tecnologia* 14: 274-278.
- Murashige, T.** 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium of rapid growth and biossays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nahoum, P.** 1994. O cultivo de bromélias e sua interferência nos processos evolutivos. *Bromélia* 1: 16-19.
- Naves, V.C.** 2001. Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Nelson, E.A., Sage, T.L. & Sage, R.F.** 2005. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* 32: 409-419.
- Nievola, C.C., Mercier, H. & Majerowicz, N.** 2001. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of Plant Nutrition* 24: 1387-1398.
- Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B.M. & Mercier, H.** 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 41: 832-837.
- Nishio, J.N. & Ting, I.P.** 1993. Photosynthetic characteristics of the palisade mesophyll and spongy mesophyll in the CAM/C₄ intermediate plant *Peperomia camptotricha*. *Botanica Acta* 106: 120-125.

- Noé, N. & Bonini, L.** 1996. Leaf anatomy of highbush blueberry grown *in vitro* and during acclimatization to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 38: 19-25.
- Nunes, J.V.C.** 2002. Bromélias. *In*: L.L. Simões & C.F. Lino (orgs.). *Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais*. SENAC, São Paulo, pp.119-132.
- O'Brien, T.P., Feder, N. & McCully, M.E.** 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluicene Blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Ohru, T., Nobira, H., Sakata, Y., Taji, T., Yamamoto, C., Nishida, K., Yamakawa, T., Sasuga, Y., Yaguchi, Y., Takenaga, H. & Tanaka, S.** 2007. Foliar trichome-and aquaporin-aided water uptake in a drought-resistant epiphyte *Tillandsia ionantha* Planchon. *Planta* 227: 47-56.
- Oliveira, M.G.N. & Rocha, C.F.D.** 1997. O efeito da complexidade da bromélia-tanque *Neoregelia cruenta* (R.Graham) L.B. Smith sobre a comunidade animal associada. *Bromélia* 4: 13-22.
- Oliveira, M.G.N., Rocha, C.F.D. & Bagnall, T.A.** 1994. A comunidade animal associada à bromélia tanque *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B.Smith. *Bromélia* 1: 22-29.
- Okimoto, M.C.** 1948. Anatomy and histology of the pineapple inflorescence and fruit. *Botanical Gazette* 110: 217-231.
- Osório, M.L., Gonçalves, S., Osório, J. & Romano, A.** 2005. Effects of CO₂ concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. *Biologia Plantarum* 49: 161-167.
- Pâques, M.** 1991. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Horticulturae* 289: 283-290.
- Pâques, M. & Boxus, P.** 1987. Vitrification: review of literature. *Acta Horticulturae* 212: 155-166.
- Pasqual, M.** 2001. *Cultura de tecidos*. UFLA/FAEPE, Lavras.

- Paul, M.** 2006. Why Alcantarea's lean?! *Bromeliaceae* 40: 38-40.
- Paula, C.C. & Silva, H.M.P.** 2001. Cultivo prático de bromélias. 2 ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Pereira, T.S.** 1988. Bromelioideae (Bromeliaceae): Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 29: 115-154.
- Pereira, A.R., Pereira, T.S.; Rodrigues, A.S. & Andrade, A.C.S.** 2008. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Botanica Brasilica* 22: 1150-1162.
- Pescador, R. & Koller, O.C.** 1992. Propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Pérola. *Revista Brasileira de Fruticultura* 14: 5-11.
- Pickens, K.A., Affolter, J.M. & Wetztein, H.Y.** 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii in vitro*. *HortScience* 38: 101-104.
- Pickens, K.A., Wolf, J., Affolter, J.M. & Wetztein, H.Y.** 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42: 348-353.
- Pierce, S.** 2007. The jeweled armor of *Tillandsia*-multifaceted or elongated trichomes provide photoprotection. *Aliso* 23:: 44-52.
- Pierce, S., Maxwell, K., Griffiths, H. & Winter, K.** 2001. Hydrophobic trichome layers and epicuticular wax powders in Bromeliaceae. *American Journal of Botany* 88: 1371-1389.
- Pierce, S., Winter, K. & Griffiths, H.** 2002. The role of CAM in high rainfall cloud forests: an *in situ* comparison of photosynthetic pathways in Bromeliaceae. *Plant, Cell and Environment* 25: 1181-1189.

- Pierik, R.L.M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Pinheiro, F. & Borghetti, F.** 2003. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesbach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Schultes F.) Mez (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica* 17:27-35.
- Pompelli, M.F.** 2006. Germinação de *Dyckia encholirioides* var *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). *Floresta e Ambiente* 13: 1-19.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. & Plzáková, Š.** 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497.
- Prado, A., Michelangeli, C., Mogollón, N. & Alvarado, G.** 2008. Regeneración *in vitro* de *Bilbergia rósea* Hortus ex Beer a partir de ápices caulinares. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 42: 491-505.
- Proença, S.L. & Sajo, M.G.** 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 657-673.
- Proença, S.L. & Sajo, M.G.** 2008. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. *Rodriguésia* 59: 113-128.
- Primack, R.B. & Rodrigues, E.** 2001. *Biologia da Conservação*. Editora Vida, Londrina.
- Radambrasil.** 1983. Levantamento dos Recursos Naturais. Ministério das Minas e Energia 32: 23-24.
- Radmann, E.B., Braga, E.J.B., Karan, M.A.L., Posada, M.A.C. & Peters, J.A.** 2001. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. *Revista Brasileira de Agrociência* 7: 171-175.
- Rech Filho, A., Vesco, L.L.D., Nodari, R.O., Lischka, R.W., Muller, C.V. & Guerra, M.P.** 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii*

- Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* 14: 1799-1808.
- Reinert, F. & Meirelles, S.T.** 1993. Water acquisition strategy shifts in the heterophyllous saxicolous bromeliad, *Vriesea geniculata* (Wawra) Wawra. *Selbyana* 14: 80-88.
- Reitz, R.** 1950. Plantas medicinais de Santa Catarina. *Anais botânicos do herbário Barbosa Rodrigues*. Itajaí 2: 71-116.
- Reitz, R.** 1983. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense*, Itajaí.
- Robinson, H.** 1969. A monograph on foliar anatomy of the genera *Connelia*, *Cottendorfia* and *Navia* (Bromeliaceae). *Smithsonian Contributions of Botany* 2: 1-41.
- Rocha, C.F.D., Cogliatti-Carvalho, L. Almeida, D.R. & Freitas, A.F.N.** 1997. Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. *Bromélia* 4: 7-10.
- Rocha, C.F.D., Cogliatti-Carvalho, L., Nunes-Freitas, A.F., Rocha-Pessôa, T.C., Dias, A.S., Ariani, C.V. & Morgado, L.N.** 2004. Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. *Vidalia* 2: 52-68.
- Rodrigues, T.M., Paiva, P.D.O., Rodrigues, C.R., Carvalho, J.G., Ferreira, C.A. & Paiva, R.** 2004. Desenvolvimento de mudas de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. *Ciência e Agrotecnologia* 28: 757-763.
- Rodrigues, P.H.V., Lima, A.M.L.P., Ambrosano, G.M.B. & Dutra, M.F.B.** 2005. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. *Scientia Agricola* 62: 299-301.
- Rodríguez-Estrella, R. & Moreno, M.C.B.** 2006. Rare, fragile species, small populations, and the dilemma of collections. *Biodiversity and Conservation* 15: 1621-1625.

- Rohrbach, K.G., Leal, F. & d'Eeckenbrugge, G.C.** 2003. History, distribution and world production. *In*: D.P. Bartholomew, R.E. Paull & K.G. Rohrbach (eds.). The Pineapple: botany, production and uses. CABI Publishing, New York, pp. 1-12.
- Rousse, A.R.** 1992. Bromelias: Manual práctico de cultivo. Fondo Editorial Tropykos, Cararacas.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E. & Olmos, E.** 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 120: 152-161.
- Sakai, W.S. & Sandford, W.G.** 1980. Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). *Annals of Botany* 46:7-11.
- Sallanon, H., Laffray, D. & Coudret, A.** 1991. Ultrastructure and functioning of guard cells of *in vitro* cultured rose plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 333-339.
- Sallanon, H., Tort, M. & Coudret, A.** 1993. The ultrastructure of micropropagated and greenhouse rose plant stomata. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 227-233.
- Santos, A.J., Bittencourt, A.M. & Nogueira, A.S.** 2005. Aspectos econômicos da cadeia produtiva das bromélias na região metropolitana de Curitiba e litoral paranaense. *Floresta* 35: 409-417.
- Santos, D.S.** 2009. Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Sarasan, V.A., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. & Rowntree, J.K.** 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42: 206-214.
- Sass, C. & Specht, C.D.** 2010. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 559-571.

- Scatena, V.L., Segecin, S. & Coan, A.I.** 2006. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 945-951.
- Schmidt, G. & Zotz, G.** 2001. Ecophysiological consequences of differences in plant size: *in vitro* carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. *Plant, Cell and Environment* 24: 101-111.
- Schulte, K., Horres, R. & Zizka, G.** 2005. Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implication on biogeography and the evolution of CAM in the family. *Senckenbergiana Biologica* 85: 113-125.
- Schulte, K., Barfuss, M.H. & Zizka, G.** 2009. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 327-339.
- Schultz, A.** 1990. *Introdução à Botânica Sistemática*. 6 ed. Sagra, Porto Alegre, v. 2.
- Segecin, S. & Scatena, V.L.** 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 28: 635-649.
- Shim, S.-W., Hahn, E.-J. & Paek, K.-Y.** 2003. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock ‘5BB’ as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 57-62.
- Silva, A.L.L., Dornelles, E.B., Bisognin, D.A., Franco, E.T.H. & Horbach, M.A.** 2007. Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral – an extinction threatened bromeliad. *Iheringia, Série Botânica*, 62: 39-43.
- Silva, A.L.L., Franco, E.T.H., Dornelles, E.B., Bortoli, C.L.R. & Quoirin, M.** 2009. *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E.Morren (Bromeliaceae). *Iheringia, Sér. Bot.* 64: 151-156.

- Silveira, D.G., Souza, F.V.D., Pelacani, C.R., Souza, A.S., Ledo, C.A.S. & Santana, J.R.F.** 2009. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 923-932.
- Simões, F.C., Paiva, P.D.O., Paiva, R., Pasqual, M. & Carvalho, L.M.** 2001. Enraizamento, pré-aclimatização e aclimatização de plântulas de gladiolo. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 7: 143-147.
- Sipes, D.L. & Ting, I.P.** 1985. Crassulacean acid metabolism and crassulacean acid metabolism modifications in *Peperomia camptotricha*. *Plant Physiology* 77: 59-63.
- Skrebsky, E.C., Nicoloso, F.T. & Ferrão, G.E.** 2004. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). *Ciência Rural* 34: 1471-1477.
- Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. 14: 1-648.
- Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. 14: 661-1492.
- Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. 14: 1493-2142.
- Sobrinho, F.S., Pereira, A.V., Lédo, F.J.S., Oliveira, J.S. & Vargas, S.M.** 2007. Aclimatização de germoplasma de capim-elefante, pós cultivo *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia* 31: 11-15.
- Sorace, M., Faria, R.T., Damasceno Júnior, C.V., Gomes, G.P., Barbosa, C.M., Vieira, F.G.N., Silva, G.L., Takahashi, L.S.A. & Schnitzer, J.A.** 2008. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. *Semina: Ciências Agrárias* 29: 775-782.

- Souza, R.C.O.S. & Neves, L.J.** 1996. Leaf anatomy of four *Tillandsia* species. *Bromélia* 3: 28-39.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H.** 2005. Botânica Sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Souza, A.V. & Pereira, A.M.S.** 2007. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 9: 103-117.
- Stewart, S.L., Zettler, L.W., Minso, J. & Brown, P.M.** 2003. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. *Selbyana* 24: 64-70.
- Strehl, T.** 1983. Forma, distribuição e flexibilidade dos tricomas foliares usados na filogenia de Bromeliaceae. *Iheringia, Sér. Bot.* 31: 105-119.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2009. *Fisiologia Vegetal*. 4 ed. Artmed: Porto Alegre.
- Takaki, M.** 2001. New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13: 104-108.
- Tamaki, V., Machado, B.M., Nievola, C.C. & Kanashiro, S.** 2006. Preservação *in vitro* das bromélias ornamentais *Alcantarea imperialis*, *Neoregelia marmorata* e *Quesnelia testudo*. *In: Anais do XVI Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Unimep, Piracicaba.*
- Tamaki, V., Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34: 67-73.
- Tardivo, R.C. & Cervi, A.C.O.** 1997. Gênero *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) no estado do Paraná. *Acta Botanica Brasilica* 11: 237-258.

- Teixeira, R.L., Mili, P.S.M. & Roedder, D.** 2006. Ecology of anurans inhabiting bromeliads in a saxicolous habitat of southeastern Brazil. *Salamandra* 42:155-163.
- Teng, W.-L.** 1997. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. *Plant Cell Reports* 16: 454-457.
- Terceiro Neto, C.P.C., Hernandez, F.F.F., Bezerra, F.C., Sousa, R.F. & Cavalcanti, M.L.C.** 2004. Efeito de diferentes substratos na aclimatação “*ex vitro*” de mudas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 4: 1-6.
- Termignoni, R.R.** 2005. Cultura de tecidos vegetais. Editora da UFRGS, Porto Alegre.
- Thorpe, T.A.** 1982. Carbohydrate utilization and metabolism. *In*: J.M. Bonga & D.J. Durzan (eds.). *Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, The Hague, pp. 325-368.
- Thorpe, T.A. & Harry, I.S.** 1997. Application of tissue culture to horticulture. *Acta Horticulturae* 447: 39-49.
- Tichá, I., Radochová, B. & Kadleček, P.** 1999. Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 469-474.
- Tillich, H.-J.** 2007. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). *Annals of Botany* 100: 1413-1429.
- Tombolato, A.F.C., Takebayashi, S.S.G., Costa, A.M.M. & Quirino, E.A.** 1991. Cultura *in vitro* da bromélia. *O Agrônômico* 43: 77-78.
- Tomlinson, P.S.** 1969. Anatomy of the Monocotyledons. III Commelinales-Zingiberales. Oxford University Press, Oxford.
- Torres, A. C., Caldas, L. S. & Buso, J. A.** 1998. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Embrapa, Brasília. Volume I e II.

- van Staden, J., Fennell, C.W. & Taylor, N.J.** 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 15-22.
- Varadarajan, G.S. & Gilmartin, A.J.** 1987. Foliar scales of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Systematic Botany* 12:562-571.
- Veierskov, B.** 1988. Relations between carbohydrates and adventitious root formation. *In*: T.D. Davis, B.E. Haissig & N. Sankhla (eds.). *Adventitious root formation in cuttings*. Dioscorides Press, Portland, v.2, pp. 70-78.
- Versieux, L.M.** 2009. Sistemática, filogenia e morfologia de *Alcantarea* (Bromeliaceae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Versieux, L.M. & Wanderley, M.G.L.** 2007a. *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms. *In*: M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti (coord.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 59-62.
- Versieux, L.M. & Wanderley, M.G.L.** 2007b. Two new species of *Alcantarea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from Brazil. *Brittonia* 59: 57-64.
- Versieux, L.M. & Wanderley, M.G.L.** 2007c. A new species of *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, Bromeliaceae. *Hoehnea* 34: 409-413.
- Vesco, L.L.D., Pescador, R., Beló, A., Feuser, S., Oliveira, E.N., Brancher, A., Zaffari, G.R., Nodari, R.O. & Guerra, M.P.** 2000. Qualidade genotípica de mudas e performace a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura* 22: 80-85.
- Victório, C.P., Kuster, R.M. & Lage, C.L.S.** 2007. Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 213-215.

- Vieira, D.C.M., Socolowski, F. & Takaki, M.** 2007. Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 183-188.
- Vinterhalter, B. & Vinterhalter, D.** 1994. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. *Scientia Horticulturae* 57: 253-263.
- Voltolini, C.H., Reis, A. & Santos, M.** 2009. Leaf morphoanatomy of the rheophyte *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 7: 335-343.
- Wanderley, M.G.L. & Martins, S.E.** 2007. Bromeliaceae. *In*: M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti (coord.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 39-161.
- Wiesbauer, M.B., Scariot, E.C., Sasaki, L.L. & Reis, A.** 2007. Influência da luz e inundação na germinação de *Dyckia distachya* Hassler, uma bromélia em vias de extinção. *Revista Brasileira de Biociências* 5:717-719.
- Zepeda, C. & Sagawa, Y.** 1981. *In vitro* propagation of pineapple. *HortScience* 16:495.
- Zhang, B. & Stoltz, L.P.** 1989. Acclimatization systems for *Euphorbia fulgens* microcuttings. *HortScience* 24: 1025-1026.
- Zimmerman, R.H.** 1995. Environmental effects and their control in plant tissue culture – overview. *Acta Horticulturae* 393: 11-14.
- Ziv, M., Yogev, T. & Krebs, O.** 1986. Effects of paclobutrazol and chlormequat on growth pattern and shoot proliferation of normal and variant *Aechmea fasciata* Baker plant regenerated *in vitro*. *Israel Journal of Botany* 35: 175-182.
- Zornig, R.K.** 1996. Micropropagação de bromélias. *Bromélia* 3: 3-8.

X. ANEXOS

Anexo 1 – Dados biométricos de número de raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	1,98 ± 0,25 fA	2,92 ± 0,80 fA	4,46 ± 1,30 eA	7,64 ± 1,92 dA	8,94 ± 1,83 cA	10,54 ± 1,80 bA	15,86 ± 2,44 aA
Estufa	1,86 ± 0,35 eA	2,36 ± 0,53 deB	2,8 ± 0,81 cdB	3,14 ± 0,99 cB	4,14 ± 1,11 bB	4,84 ± 0,96 aB	4,88 ± 1,42 aB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 2 – Dados biométricos de comprimento de raízes (cm) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0,41 ± 0,13 eA	1,04 ± 0,17 dA	1,33 ± 0,32 dA	3,79 ± 0,97 cA	3,70 ± 0,80 cA	4,79 ± 1,29 bA	6,77 ± 1,60 aA
Estufa	0,28 ± 0,14 cB	0,38 ± 0,16 cB	0,55 ± 0,30 cB	0,78 ± 0,29 cB	1,36 ± 0,47 bB	1,76 ± 0,57 aB	1,48 ± 0,49abB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 3 – Dados de massa fresca das raízes (mg) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0,66 ± 0,07 cA	3,61 ± 0,60 cA	12,51 ± 1,38 cA	57,15 ± 6,87 bcA	101,88 ± 13,59 bcA	146,84 ± 6,66 bA	398,21 ± 90,50 aA
Estufa	0,63 ± 0,19 cA	0,64 ± 0,03 cB	2,54 ± 0,44 cB	3,46 ± 0,42 bcB	7,04 ± 0,82 abB	7,84 ± 2,57 aB	9,86 ± 0,83 aB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 4 – Dados de massa seca das raízes (mg) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0,1 ± 0,009 cA	0,44 ± 0,07 cA	1,05 ± 0,04 cA	7,08 ± 0,50 bcA	16,44 ± 1,98 bA	14,95 ± 1,17 bA	55,05 ± 10,19 aA
Estufa	0,07 ± 0,002 cB	0,12 ± 0,02 cB	0,31 ± 0,09 cB	0,64 ± 0,12 bcB	1,06 ± 0,05 abB	1,31 ± 0,43 aB	1,42 ± 0,11 aB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 5 – Dados biométricos de número de folhas saudáveis de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	3,56 ± 0,50 eA	5,84 ± 0,51 dA	9,5 ± 0,97 cA	12,34 ± 1,53 abA	11,84 ± 1,22 bA	11,88 ± 1,87 bB	12,82 ± 1,66 aA
Estufa	3,58 ± 0,50 fA	4,54 ± 0,61 eB	7,56 ± 1,09 dB	9,3 ± 1,23 cB	11,08 ± 1,52 bB	13,2 ± 1,77 aA	12,46 ± 2,11 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 6 – Dados biométricos de número de folhas mortas de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0 ± 0 eA	0 ± 0 eA	0 ± 0 eB	1,58 ± 1,54 dA	3,86 ± 1,31 cA	7,62 ± 1,68 bA	9,56 ± 1,95 aA
Estufa	0 ± 0 dA	0,02 ± 0,14 dA	0,78 ± 0,72 cA	0,9 ± 0,74 dB	2,64 ± 1,22 aB	2,08 ± 1,10 bB	3,08 ± 1,41 aB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 7 – Dados biométricos de comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	1,37 ± 0,20 gA	2,27 ± 0,22 fA	5,55 ± 0,82 eA	8,29 ± 1,10 dA	12,73 ± 2,06 cA	16,01 ± 1,47 bA	20,77 ± 2,31 aA
Estufa	1,28 ± 0,13 fA	1,59 ± 0,23 fB	2,41 ± 0,28 eB	4,19 ± 0,49 dB	5,65 ± 0,69 cB	6,81 ± 0,72 bB	8,67 ± 1,06 aB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 8 – Dados de massa fresca da parte aérea (mg) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	8,34 ± 0,70 eA	24,94 ± 0,28 eA	100,35 ± 6,53 deA	237,96 ± 6,32 dA	554,72 ± 5,22 cA	1017,60 ± 37,35 bA	1713,85 ± 111,75 aA
Estufa	8,72 ± 0,72 eA	10,3 ± 0,47 eB	32,46 ± 0,16 dB	78,93 ± 1,04 cB	199,13 ± 5,48 bB	207,34 ± 10,69 bB	319,70 ± 8,80 aB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 9 – Dados de massa seca da parte aérea (mg) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0,66 ± 0,08 cA	1,86 ± 0,06 cA	8,14 ± 0,53 cA	18,20 ± 0,33 bcA	44,69 ± 0,84 bcA	56,72 ± 1,14 bA	185,43 ± 33,77 aA
Estufa	0,57 ± 0,03 fA	0,77 ± 0,008 efB	2,74 ± 0,10 eB	6,47 ± 0,23 dB	12,91 ± 0,56 cB	16,24 ± 0,39 bB	23,94 ± 1,46 aB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 10 – Valores médios de clorofila *a* (μg) por massa fresca (g) das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	641,47 \pm 24,50 aA	616,83 \pm 50,73 abA	600,77 \pm 32,98 abA	484,56 \pm 36,35 bcA	531,27 \pm 50,11 abA	443,31 \pm 46,34 cB	638,94 \pm 38,07 aA
Estufa	414,09 \pm 8,46 cB	435,69 \pm 46,58 bcA	564,70 \pm 12,72 aA	566,26 \pm 28,38 aA	499,52 \pm 43,88 abcA	576,29 \pm 19,61 aA	534,82 \pm 30,54 abA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 11 – Valores médios de clorofila *b* (μg) por massa fresca (g) das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	229,67 \pm 44,14aA	231,04 \pm 48,59 aA	211,57 \pm 49,47 aA	183,07 \pm 43,26 aA	199,70 \pm 32,78 aA	232,74 \pm 53,49 aA	242,24 \pm 45,26 aA
Estufa	193,81 \pm 0,91 aA	184,20 \pm 18,18 aA	239,32 \pm 7,68 aA	239,52 \pm 12,77 aA	256,23 \pm 42,90 aA	243,50 \pm 23,91 aA	232,91 \pm 14,20 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 12 – Valores médios de carotenóides (μg) por massa fresca (g) das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	158,18 \pm 15,21 aA	141,98 \pm 17,05 abA	144,29 \pm 5,17 abA	123,25 \pm 6,82 abA	137,84 \pm 24,48 abA	103,77 \pm 14,05 bA	171,35 \pm 27,36 aA

Estufa 97,87 ± 0,88 bB 101,10 ± 11,10 bA 127,02 ± 4,75 aA 117,45 ± 5,06 abA 104,70 ± 9,15 abA 128,89 ± 6,21 aA 120,11 ± 7,57 abA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 13 - Delta dos valores de número de raízes: $NR = (n_2 n_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, comprimento de raízes: $CR = (cm_2 cm_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, número de folhas sadias: $NFs = (n_2 n_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, número de folhas mortas: $NFm = (n_2 n_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, comprimento de folha: $CF = (cm_2 cm_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$ das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e em condições de estufa por 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância.

DELTA										
Períodos	<i>In vitro</i>					Estufa				
	NR	CR	NFs	NFm	CF	NR	CR	NFs	NFm	CF
1-2	0,39	0,92	0,49	-	0,50	0,24	0,33	0,24	(*)	0,21
2-4	0,21	0,12	0,24	-	0,45	0,08	0,18	0,25	1,82	0,21
4-6	0,27	0,52	0,13	0,23	0,20	0,06	0,17	0,10	0,08	0,28
6-8	0,08	(*)	(*)	0,45	0,21	0,14	0,28	0,9	0,54	0,15
8-10	0,08	0,13	(*)	0,34	0,11	0,08	0,13	0,9	(*)	0,09
10-12	0,20	0,17	0,04	0,11	0,13	(*)	(*)	(*)	0,20	0,12

(*) tende a zero

Anexo 14 – Dados biométricos de número de raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	1,98 ± 0,25 fB	2,92 ± 0,80 fB	4,46 ± 1,30 eB	7,64 ± 1,92 dB	8,94 ± 1,83 cB	10,54 ± 1,80 bB	15,86 ± 2,44 aB
Aclimatada	2,90 ± 0,68 dA	5,98 ± 1,15 cA	6,32 ± 1,17 cA	12,38 ± 2,91 bA	13,60 ± 2,86 bA	13,30 ± 2,70 bA	19,60 ± 3,39 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 15 – Dados biométricos de comprimento de raízes (cm) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0,41 ± 0,13 eB	1,04 ± 0,17 dB	1,33 ± 0,32 dB	3,79 ± 0,97 cB	3,70 ± 0,80 cB	4,79 ± 1,29 bA	6,77 ± 1,60 aA
Aclimatada	0,67 ± 0,30 eA	1,52 ± 0,59 dA	2,83 ± 0,84 cA	4,83 ± 1,00 bA	5,04 ± 1,04 bA	5,01 ± 1,33 bA	7,06 ± 1,35 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 16 – Dados de massa fresca das raízes (mg) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0,66 ± 0,07 cB	3,61 ± 0,60 cB	12,51 ± 1,38 cA	57,15 ± 6,87 bcA	101,88 ± 13,59 bcA	146,84 ± 6,66 bA	398,21 ± 90,50 aA
Aclimatada	1,59 ± 0,16 dA	11,78 ± 2,03 dA	10,42 ± 2,24 dA	68,32 ± 18,66 cA	104,24 ± 15,78 bcA	120,33 ± 18,38 bA	435,17 ± 8,77 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 17 – Dados de massa seca das raízes (mg) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0,1 ± 0,009 cB	0,44 ± 0,07 cB	1,05 ± 0,04 cA	7,08 ± 0,50 bcA	16,44 ± 1,98 bA	14,95 ± 1,17 bA	55,05 ± 10,19 aA
Aclimatada	0,32 ± 0,04 dA	1,74 ± 0,28 dA	1,47 ± 0,34 dA	11,23 ± 1,98 cA	16,86 ± 1,39 bA	15,71 ± 2,95 bcA	59,00 ± 1,65 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 18 – Dados biométricos de número de folhas saudáveis de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	3,56 ± 0,50 eB	5,84 ± 0,51 dB	9,5 ± 0,97 cB	12,34 ± 1,53 abA	11,84 ± 1,22 bA	11,88 ± 1,87 bA	12,82 ± 1,66 aA
Aclimatada	5,98 ± 0,62 cA	10,80 ± 0,95 abA	10,76 ± 1,10 abA	10,12 ± 1,96 bB	10,58 ± 1,53 bB	11,58 ± 1,58 aA	10,86 ± 1,71 abB

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 19 – Dados biométricos de número de folhas mortas de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0 ± 0 eA	0 ± 0 eB	0 ± 0 eB	1,58 ± 1,54 dB	3,86 ± 1,31 cA	7,62 ± 1,68 bA	9,56 ± 1,95 aA
Aclimatada	0 ± 0 eA	0,32 ± 0,55 eA	1,86 ± 1,01 dA	4,04 ± 1,09 cA	2,14 ± 0,73 dB	6,06 ± 1,54 bB	9,76 ± 2,21 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 20 – Dados biométricos de comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	1,37 ± 0,20 gB	2,27 ± 0,22 fB	5,55 ± 0,82 eB	8,29 ± 1,10 dB	12,73 ± 2,06 cB	16,01 ± 1,47 bB	20,77 ± 2,31 aB
Aclimatada	3,19 ± 0,34 fA	5,58 ± 0,68 eA	7,50 ± 0,83 dA	17,47 ± 2,40 cA	21,91 ± 3,08 bA	18,04 ± 1,81 cA	24,08 ± 2,92 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 21 – Dados de massa fresca da parte aérea (mg) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	8,34 ± 0,70 eB	24,94 ± 0,28 eB	100,35 ± 6,53 deB	237,96 ± 6,32 dB	554,72 ± 5,22 cB	1017,60 ± 37,35 bB	1713,85 ± 111,75 aB
Aclimatada	38,97 ± 1,78 dA	163,87 ± 11,54 dA	172,40 ± 28,08 dA	1016,01 ± 55,55 cA	1533,60 ± 91,16 bA	1504,93 ± 38,20 bA	2812,30 ± 29,41 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 22 – Dados de massa seca da parte aérea (mg) de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	0,66 ± 0,08 cB	1,86 ± 0,06 cB	8,14 ± 0,53 cA	18,20 ± 0,33 bcB	44,69 ± 0,84 bcB	56,72 ± 1,14 bB	185,43 ± 33,77 aA
Aclimatada	2,37 ± 0,04 dA	11,29 ± 0,38 dA	12,61 ± 1,90 dA	66,86 ± 2,34 cA	115,55 ± 13,60 bA	109,87 ± 4,56 bA	201,60 ± 15,48 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 23 – Valores médios de clorofila *a* (μg) por massa fresca (g) das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	641,47 \pm 24,50 aA	616,83 \pm 50,73 abA	600,77 \pm 32,98 abA	484,56 \pm 36,35 bcA	531,27 \pm 50,11 abA	443,31 \pm 46,34 cA	638,94 \pm 38,07 aA
Aclimatada	438,54 \pm 17,72 bcB	492,04 \pm 46,23 bA	502,45 \pm 24,48 abA	344,36 \pm 26,28 cdB	314,77 \pm 27,57 dB	305,44 \pm 29,44 dA	596,57 \pm 22,15 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 24 – Valores médios de clorofila *b* (μg) por massa fresca (g) das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	229,67 \pm 44,14 aA	231,04 \pm 48,59 aA	211,57 \pm 49,47 aA	183,07 \pm 43,26 aA	199,70 \pm 32,78 aA	232,74 \pm 53,49 aA	242,24 \pm 45,26 aA
Aclimatada	158,02 \pm 37,10 aA	217,68 \pm 21,07 aA	184,80 \pm 66,28 aA	145,61 \pm 41,12 aA	199,37 \pm 24,50 aA	177,47 \pm 32,56 aA	270,59 \pm 76,38 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 25 – Valores médios de carotenóides (μg) por massa fresca (g) das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Tipo de cultivo	Períodos de cultivo						
	1 mês	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>In vitro</i>	158,18 \pm 15,21 aA	141,98 \pm 17,05 abA	144,29 \pm 5,17 abA	123,25 \pm 6,82 abA	137,84 \pm 24,48 abA	103,77 \pm 14,05 bA	171,35 \pm 27,36 aA
Aclimatada	110,67 \pm 8,68 bB	104,65 \pm 8,29 bcA	117,31 \pm 10,282 abA	88,39 \pm 17,38 bcA	65,32 \pm 12,98 cA	71,14 \pm 5,01 bcA	159,72 \pm 17,81 aA

Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias com a mesma letra não diferem entre si em nível de 1% pelo teste de Tukey.

Anexo 26 - Delta dos valores de número de raízes: $NR = (n_2 n_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, comprimento de raízes: $CR = (\text{cm}_2 \text{cm}_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, número de folhas sadias: $NFs = (n_2 n_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, número de folhas mortas: $NFm = (n_2 n_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$, comprimento de folha: $CF = (\text{cm}_2 \text{cm}_1^{-1}) \text{ mês}^{-1}$ das plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses. Esses índices fisiológicos por serem dados calculados, não obedecem às pressuposições básicas para a análise de variância.

DELTA					
Meses <i>In vitro</i>	NR	CR	NFs	NFm	CF
1	0,19	0,24	0,26		0,42
2	0,36	0,19	0,31	(*)	0,45
4	0,17	0,38	0,06	0,31	0,15
6	0,24	0,12	(*)	0,47	0,37
8	0,21	0,15	(*)	(*)	0,27
10	0,12	0,02	(*)	(*)	0,06
12	0,11	0,02	(*)	0,01	0,07

(*) tende a zero