

FLÁVIA MARIA KAZUE KURITA

Crescimento *in vitro* da bromélia
***Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms**
com diferentes concentrações de
nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio

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

SÃO PAULO

2011

FLÁVIA MARIA KAZUE KURITA

Crescimento *in vitro* da bromélia
***Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms**
com diferentes concentrações de
nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio

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

ORIENTADORA: DRA. VÍVIAN TAMAKI

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Kurita, Flávia Maria Kazue
K96c Crescimento *in vitro* da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio / Flávia Maria Kazue Kurita -- São Paulo, 2011.
64 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2011
Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Nutrição mineral. 3. Micropropagação. I. Título

CDU: 582.564

“As decepções, as derrotas,
o desânimo são ferramentas que
Deus utiliza para mostrar a estrada”

Paulo Coelho

“A percepção do desconhecido é a
mais fascinante das experiências.
O homem que não tem os olhos abertos
para o misterioso passará pela
vida sem ver nada”

Albert Einstein

“Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
De árvores alheias ...”

Fernando Pessoa

Dedico,

Aos meus pais Osvaldo e Odinéia
e ao meu irmão Wilian,

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de Mestrado (Fapesp 2009/03070-4).

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.

Agradeço à Dra. Vívian Tamaki, pela orientação, pelo bom convívio e paciência durante a execução do projeto e por acreditar em meu trabalho.

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

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Edson Paulo Chu, Dr. Rogério Mamoru Suzuki e Dr. Luciano Freschi, pelas valiosas contribuições e aos membros da banca examinadora da dissertação, Dr. Rogério Mamoru Suzuki e Dra. Maria Aurineide Rodrigues, pelas valiosas sugestões.

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, em especial ao Dr. Shoey Kanashiro, pelos conhecimentos transmitidos e pela excelente convivência.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais - Ivomar Aparecido Medina, Cleonice Righetti de Campos e em especial ao Jorge Luiz Marx Young, pelo companheirismo e momentos de descontração.

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

Ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, pelo empréstimo do moinho de bola, em especial a técnica de laboratório, Mary, pela atenção e bom atendimento prestado.

Ao Dr. Francisco Antônio Monteiro e a técnica Ednéia S. Mondoni, do Departamento de Ciência do Solo (ESALQ), pela atenção e bom atendimento prestado.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, em especial Camila Pereira de Carvalho, pela amizade e apoio durante a realização do Mestrado, também à Daniela Soares dos Santos, Sarah Moreno Carrião e João Paulo Romão Santos, Elisa Mitsuko Aoyama, Luciana Mollo, Sabrina de Andrade, Adilson Zompero, Priscila Primo, Adriana Barbosa, David Marun meus agradecimentos por tudo e pela convivência no laboratório. A Jaqueline Jorge, pela amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

Muito obrigada !!!!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
I) INTRODUÇÃO	1
I. 1) Bromeliaceae.....	1
I. 2) A espécie <i>Alcantarea imperialis</i>	2
I. 3) Cultivo <i>in vitro</i> de bromélias e preservação	5
I. 4) Principais macronutrientes	5
II) OBJETIVO.....	9
III) MATERIAL E MÉTODOS.....	10
III. 1) Material vegetal.....	10
III. 2) Obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	10
III. 3) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de nitrogênio (N)	11
III. 4) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de fósforo (P)	11
III. 5) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de potássio (K).....	12
III. 6) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de cálcio (Ca).....	13
III. 7) Crescimento com as concentrações mais adequadas de N, P, K e Ca	14
III. 8) Parâmetros avaliados.....	15
III. 8.1) Análise biométrica.....	15
III. 8.2) Determinação de massa	15
III. 8.3) Determinação do teor de clorofila e de carotenóides	15
III. 8.4) Análise da concentração endógena de elementos minerais	16
III. 9) Delineamento estatístico	16
IV) RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
IV.1) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de nitrogênio (N)	17
IV.2) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de fósforo (P)	28
IV.3) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de potássio (K).....	38
IV.4) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de cálcio (Ca)	43
IV.5) Crescimento com as concentrações mais adequadas de N, P, K e Ca	48
V) CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
VI) RESUMO	56
VII) ABSTRACT.....	57
VIII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

I) INTRODUÇÃO

I. 1) Bromeliaceae

A família Bromeliaceae apresenta 60 gêneros e 3.170 espécies (Luther 2008). São plantas perenes que possuem uma grande variedade de formas, cores e tamanhos. Ocorrem, preferencialmente, nas zonas tropicais, estendendo-se desde a América do Norte até a América do Sul, sendo apenas uma espécie de ocorrência no continente africano, a *Pitcairnia feliciania* (A. Chev.) Harms & Mildbraed (Benzing, 2000). Habitam praticamente todos os ambientes, estendendo-se do nível do mar à cordilheira dos Andes e desde locais úmidos como a Mata Atlântica até regiões secas como a Caatinga (Nunes 2006). Podem ser terrícolas, rupícolas, sendo que a maioria é epífita possuindo mecanismos adaptativos como redução do tamanho e função das raízes, além de estratégias de polinização e dispersão de sementes. Nenhuma espécie é parasita (Leme & Marigo 1993).

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).

Esta família apresenta três subfamílias, Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae (Benzing 2000). Os membros de Pitcairnioideae e Bromelioideae possuem raízes extensas, com função de absorção de água e nutrientes, um caule muito reduzido e muitas folhas, as quais podem formar o tanque, denominação esta, em função da capacidade de acumular água no espaço central da roseta formado pela sobreposição das bases foliares.

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).

A subfamília Tillandsioideae possui hábito epífita, com sistemas radicular e caulinar reduzidos, por isso as raízes têm função de aderência ao substrato ou à planta hospedeira, sendo a absorção de nutrientes realizada pelas folhas (Mercier 2004).

Em termos ecológicos, as bromélias formam um sistema de interceptação e estocagem de nutrientes que são disponibilizados para o ambiente. A evaporação da água dos tanques

contribui para manutenção da umidade da mata, além de ser utilizada pela fauna em períodos de seca e para reprodução (Terao *et al.* 2005).

Outro aspecto a ser considerado é o de preservação. De acordo com Nunes (2006), as bromélias são muito utilizadas na ornamentação, devido às suas inflorescências que duram muitos meses e às suas folhas vistosas, elevando o risco de entrarem em extinção, pois muitas são extraídas ilegalmente de seus habitats.

Segundo Duran & Monteiro (2001) o paisagismo no Estado de São Paulo contribuiu para o aumento da utilização de plantas nativas brasileiras, principalmente, as bromélias. As bromélias estão na moda, porém os produtores não disponibilizam plantas suficientes para atender ao mercado consumidor, com isso, aumentando a procura por exemplares extraídos da mata ilegalmente, levando à extinção de algumas espécies.

Um exemplo desse fato é observado para a bromélia imperial, *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms que é endêmica da Serra dos Órgãos no Rio de Janeiro, e, portanto, potencialmente ameaçada de extinção. Santos *et al.* (2005), também ressaltam a importância de se estudar aspectos econômicos das bromélias, mostrando as relações de extração da natureza até o consumidor final. Neste contexto a *A. imperialis* foi encontrada em todos os estabelecimentos comerciais amostrados que incluem produtores e comerciantes, por isso tem grande importância os estudos para se preservar desta bromélia.

I. 2) A espécie *Alcantarea imperialis*

O gênero *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms é endêmico do Brasil e compreende cerca de 22 espécies que, freqüentemente, 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). Segundo Barbara *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.

Dentre as espécies de *Alcantarea*, destaca-se *A. imperialis* (sinonímia *Vriesea imperialis* Carrière) (Figura 1), da 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).



Figura 1: *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. (a) Planta adulta em estágio vegetativo no Instituto de Botânica (SP). (b) e (c) Exemplos com flores. (d) Frutos da espécie. (e) Semente, mostrando o apêndice plumoso, em destaque. (f) Destacando o seu valor como planta ornamental, vista de um jardim em São Paulo (SP). (g) Aspecto de um viveiro de produção no Rio de Janeiro (RJ).

A. imperialis é uma planta de grande porte, heliófila, rupícola ou saxícola, geralmente formando grandes aglomerados populacionais, com folhas de até 150 cm de comprimento, numerosas e muito largas (20 cm). Forma roseta de cor verde até vermelho-escura com inflorescência de dois a três metros de altura. 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 (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 (Martinelli 1997). A bromélia imperial pode reter, entre suas bainhas foliares, vários litros de água chegando até 30 litros. 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, onde a planta não pode contar com a apreensão pela roseta de muito material orgânico, como acontece em ambientes florestais (Naves 2001, Bert 2007). Tal limitação de desenvolvimento pode prejudicar o estabelecimento da plântula (Maun, 1994).

Segundo Naves (2001), esta bromélia emitir brotações laterais como a maioria das plantas dessa família, porém estes brotos não se desenvolvem, sendo a sua principal forma de reprodução sexuada, com produção de sementes em abundância e com alta viabilidade. 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*, eles 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*.

Com a exploração e a destruição constante da 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 2006, Mercier & Nievola 2003). Entre essas áreas, está a região da Serra dos Órgãos/RJ, habitat natural da bromélia imperial (é também encontrada em Minas Gerais) (Forzza *et al.* 2010) e cujo extrativismo local corresponde à área total de distribuição já que seus espécimes ocorrem em grandes grupamentos populacionais (Leme 1994, Carvalho 1997, Nunes 2006). Além do extrativismo, as comunidades de bromélia imperial vêm sofrendo com os frequentes incêndios na região (Graeff & Pagani 1996).

Segundo o Programa de Proteção das Espécies Ameaçadas de Extinção da Mata Atlântica Brasileira, da Fundação Biodiversitas (2007), pela avaliação do Workshop de Revisão da Lista da Flora Ameaçada de Extinção, esta bromélia se encontra na categoria espécie em perigo de extinção, isto se deve a uma redução da população por causa do declínio da área de ocupação, na qualidade do habitat ou nos níveis de exploração. A área de ocupação é estimada entre 10 e 500 km², e estimativas indicam estar severamente fragmentado entre uma a cinco localidades. Assim, medidas de conservação dessa espécie tornam-se emergentes, principalmente quando se trata de *A. imperialis*, cujas sementes perdem a viabilidade quando armazenadas a 10 °C (Machado *et al.* 2005), diminuindo a possibilidade de conservação via banco de sementes.

I. 3) Cultivo *in vitro* de bromélias e preservação

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* é uma ferramenta que tem sido utilizada nos últimos anos na conservação de espécies ameaçadas (Sarasan *et al.* 2006), visto que ele oferece várias vantagens, como grande número de plantas em curto período ao contrário dos métodos de propagação naturais que fornecem pequeno número de plantas em longo espaço de tempo, além de plantas livres de vírus e bactérias (Mercier & Nievola 2003).

O cultivo *in vitro* tem sido muito utilizado para a produção de plantas comerciais (Kanashiro *et al.* 2009). De acordo com os mesmos autores, se o objetivo for preservar o patrimônio genético da espécie, os explantes devem ser obtidos a partir da germinação de sementes que devem ser coletadas de exemplares de diferentes localidades. Um dos aspectos importantes do cultivo *in vitro* é o suprimento mineral do meio de cultura.

I. 4) Principais macronutrientes

Especialmente nos estudos de nutrição, o cultivo *in vitro* é muito apropriado, pois como as plantas são cultivadas em condições assépticas é possível controlar o fornecimento de nutrientes (Mercier 2004).

O suplemento de nutrientes no meio de cultura é essencial no sistema *in vitro* (Kanashiro *et al.* 2009). Os meios de cultura utilizados na maioria das vezes são baseados em

formulações básicas modificadas (Kanashiro 2005). Segundo Naves (2001), a importância da escolha de um meio de cultura ideal e uma concentração adequada são fundamentais, pois é o meio que supre as necessidades nutricionais para o crescimento da planta *in vitro*. Um balanço entre nitrogênio, fósforo e cálcio é essencial para a morfogênese e para o crescimento das plantas (Ramage & Williams 2002).

Segundo Ohkama-Ohtsu & Wasaki (2010) as plantas necessitam de 17 elementos essenciais para completarem o seu ciclo de vida, entre eles estão o nitrogênio, o potássio, o fósforo e o cálcio, sendo estes quatro elementos necessários em maior quantidade (White & Brown 2010).

Um dos nutrientes mais importantes é o nitrogênio (N), que segundo Raven *et al.* (2007), é o principal componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas e coenzimas. Quando em deficiência, o nitrogênio é translocado das folhas mais velhas, que apresentam clorose, para as folhas jovens que apresentam um menor desenvolvimento. Apesar da sua importância, segundo Davies (2000), são poucos os estudos em plantas envolvendo este elemento químico.

De acordo com Tamaki *et al.* (2007), parâmetros de crescimento e alguns compostos nitrogenados têm sido usados como indicadores da necessidade de adubação em monocotiledôneas como, por exemplo, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos que está relacionado com a disponibilidade de N.

As duas principais fontes de N encontradas no solo são o nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (Jackson & Volk 1995). De acordo com Inselsbacher *et al.* (2007), as formas nitrogenadas dentro do tanque de bromélias são as mesmas citadas acima, além de uréia, aminoácidos e proteínas.

O NH_4^+ é absorvido pelas raízes pelo processo ativo, quando em baixas concentrações e por processo passivo em altas concentrações (Kerbaudy 2008). Após a absorção, o íon é rapidamente assimilado na forma orgânica, pois o acúmulo do mesmo é prejudicial para a planta, uma vez que pode levar a sua morte ou prejudicar alguns processos como a respiração (Kerbaudy, 2008, Taiz & Zeiger 2010).

O NO_3^- é absorvido pelas raízes apenas por processo ativo e, em seguida, reduzido nas folhas e raízes para NH_4^+ , onde é assimilado em aminoácidos e proteínas (Kerbaudy, 2008)

Outro macronutriente é o fósforo (P) que de acordo com Raven *et al.* (2007), faz parte de compostos fosfatados (ATP e ADP), ácidos nucleicos, coenzimas e fosfolipídios. Em carência deste elemento as plantas são verde-escuras, com acúmulo de antocianinas e tornam-se vermelhas ou roxas em estágios avançados da deficiência deste nutriente, ocorrendo também há redução no crescimento. Há evidências que o P, tal como o N, é um nutriente

limitante para o crescimento de algumas bromélias (Benzing 1990, Zotz & Richter 2006) e tem recebido pouca atenção nos estudos fisiológicos (Winkler & Zotz 2009).

Russowski & Nicoloso (2003), estudaram o efeito de diferentes concentrações de P ($0 \leq P \leq 150\%$) no meio MS em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, o ginseng brasileiro, cujas raízes são de grande interesse comercial como fito medicamentos e suplementos alimentares. Os mesmos autores constataram que aos 40 dias, a altura, o número de segmentos nodais, o índice de área foliar, o número de folhas e a massa seca da parte aérea e radicular foram maiores nas concentrações próximas a 80% de P no meio MS original.

Winkler & Zotz (2009) observaram que o tanque da bromélia *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker possui um mecanismo eficiente de absorção de P e o excedente é acumulado em reservas. As folhas jovens e em desenvolvimento são, preferencialmente, supridas com este elemento nutricional.

O P é absorvido da solução do solo na forma de H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-} (Prado, 2008), porém dependendo do pH do solo, a forma absorvida se altera. Em solos com pH abaixo de 6,8, a forma predominante é H_2PO_4^- , que é a forma que predomina durante o processo de absorção. Entre pH 6,8 e 7,2; a forma é HPO_4^{2-} , que é uma forma muito pouco absorvida pelas plantas. Em solos alcalinos, a forma predominante é PO_4^{3-} , porém esta forma não é absorvida pelas plantas (Hopkins & Hüner 2008). De acordo com estes mesmos autores para otimizar a absorção de P, as plantas fazem associações com os fungos do solo.

O processo de absorção do P se dá por difusão, sendo dependente de água. Este processo ocorre em duas fases, uma passiva rápida e uma ativa mais lenta, esta última fase é mais lenta devido ao fato de ir contra um gradiente de concentração, pois nas células das raízes e na seiva do xilema a concentração de P é muito elevada comparada a solução do solo ($1\mu\text{M}$ de P). Logo após o processo de absorção é feito o transporte na mesma forma absorvida, porém redistribuído na forma orgânica, como fosforil colina ou ésteres de carboidratos. Assim o P, quando em deficiência é translocado das folhas mais velhas para mais novas (Prado 2008).

O potássio (K) é outro nutriente importante como ativador de enzimas e está envolvido com a abertura e o fechamento de estômatos, além de regular a osmose e o balanço iônico. Sua deficiência causa aparecimento de pequenas manchas pardas no ápice e nas margens, além de caules pequenos e fracos, afetando primeiramente as folhas velhas (Paula *et al.* 1998, Raven *et al.* 2007).

De acordo com Gribble *et al.* 2002, em *Gypsophila paniculada* L. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de K ($0 \leq K \leq 80 \text{ mM}$), revelaram que até a concentração de 10 mM, a massa seca e fresca das plântulas aumentou, decrescendo em concentrações maiores.

A principal forma do K no solo é a K^+ que é absorvida pela raiz por difusão, e esta absorção ocorre por vários sistemas, como canais ou transportadores. O sistema de canais é eficiente quando o K está em baixas concentrações no solo. Este nutriente não sofre assimilação, como o N, portanto encontra-se como K^+ não estando ligado a nenhum composto orgânico (Prado 2008).

O cálcio (Ca) é um componente importante da parede celular, está envolvido na permeabilidade da membrana celular, favorece também a transpiração com perda de turgescência (Raven *et al.* 2007). Sua deficiência é caracterizada com morte dos ápices caulinares e radiculares, as folhas jovens formam ganchos e depois os ápices e as margens morrem, adquirindo a aparência de terem sido cortadas, já em doses elevadas causa clorose calcária e plantas menores (Paula *et al.* 1998, Raven *et al.* 2007).

A absorção do Ca é feita unicamente pelas raízes mais novas, pois nestas as paredes celulares da endoderme não estão suberizadas, ou seja, sem as estrias de Caspary. Esta absorção é na maior parte passiva, porém pode ser ativa, dependendo dos fatores externos. O transporte é feito junto com a água, sendo afetado pela transpiração. E a redistribuição é feita pelo xilema, das raízes para a parte aérea. Como a maior parte do Ca está na estrutura da parede celular, este nutriente tem uma baixa mobilidade, por isso quando em deficiência os sintomas aparecem nas folhas novas (Prado 2008).

Embora o cultivo *in vitro* de *A. imperialis* tenha sido estabelecido (Naves 2001), a otimização da concentração de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio visando o crescimento dessa bromélia *in vitro* ainda não foi avaliada. O desenvolvimento deste trabalho poderá subsidiar trabalhos sobre a conservação *in vitro*, visto que as sementes da bromélia imperial não podem ser armazenadas por longos períodos, e a otimização da produção para atender o comércio, além de favorecer estudos futuros sobre aclimação, pois a fase da transferência das condições *in vitro* para a casa de vegetação depende, muitas vezes, das condições de desenvolvimento das plantas micropropagadas.

II) OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o crescimento de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas *in vitro* por seis meses em diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio da formulação original de MS, visando utilizar de tais ferramentas para otimizar a produção desta espécie ameaçada de extinção.

III) MATERIAL E MÉTODOS

III. 1) Material vegetal

Nos experimentos foram utilizadas sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, cujos frutos foram coletados de plantas do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica, em São Paulo. Os frutos foram abertos manualmente e suas sementes foram acondicionadas em sacos de papel pardo e armazenadas em condições de refrigeração a 10 °C.

III. 2) Obtenção de plântulas *in vitro*

As sementes, das quais os apêndices plumosos foram retirados manualmente, foram submetidas à desinfestação superficial em frasco de 250 mL contendo álcool a 70% por cinco minutos, sendo, em seguida, imersas em solução de fungicida Benomyl 1% por cinco minutos e, posteriormente, colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20, durante uma hora sob agitação. A seguir, em câmara de fluxo de ar estéril, a solução de hipoclorito foi retirada e o processo foi finalizado com quatro lavagens consecutivas das sementes com água destilada esterilizada em autoclave por 40 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram depositadas em meio de cultura de Murashige & Skoog (1962-MS) na concentração de 75% da composição original dos macronutrientes (Naves 2001), mantendo-se a concentração de micronutrientes do MS (H_3BO_3 - 6,2 mg.L^{-1} ; $\text{MnSO}_4.4\text{H}_2\text{O}$ -22,3 mg.L^{-1} ; $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ - 8,6 mg.L^{-1} ; KI- 0,83 mg.L^{-1} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ - 0,25 mg.L^{-1} ; $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ - 0,025 mg.L^{-1} ; $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ - 0,025 mg.L^{-1} ; $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ - 27,8 mg.L^{-1} e Na_2EDTA - 37,2 mg.L^{-1}), acrescidos de 100 mg.L^{-1} de *myo* inositol, 0,1 mg.L^{-1} de tiamina e 30 g.L^{-1} de sacarose.

O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH/KCl, antes da adição de 5 g.L^{-1} de agar. Em seguida, em frascos com 250 mL de capacidade foram adicionados 10 mL do meio por frasco. A esterilização dos meios foi realizada a 120 °C durante 15 minutos em autoclave a 120 °C. Em capela de fluxo laminar de ar estéril, foram depositadas 20 sementes por frasco de cultura. Os frascos de cultura foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 ± 2 °C, durante um mês após a deposição das sementes no meio de cultura.

III. 3) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de nitrogênio (N)

As plântulas obtidas foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio MS modificado com diferentes concentrações de nitrogênio (0mM; 3,75mM; 7,5 mM; 15 mM; 30 mM; 60 mM - MS original; 90 mM; 120mM; e 175mM) (Tabela 1). Cada tratamento foi realizado com 20 frascos, totalizando 180 frascos, em cada frasco foram depositadas 10 plântulas que foram mantidas sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante seis meses. Após três meses do início da transferência, as mesmas foram colocadas em novos meios de cultura com as mesmas concentrações, para garantir que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes do meio de cultura pelas plantas.

Tabela 1

Tratamentos com diferentes concentrações de nitrogênio (0; 3,75; 7,5; 15; 30; 60; 90; 120; e 175 mM) do meio MS modificado.

Saís (g L ⁻¹)	Tratamentos (mM de N)								
	0	3,75	7,5	15	30	60	90	120	175
KNO₃	-	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
NH₄NO₃	-	-	0,15	0,45	1,05	2,25	3,45	4,65	6,85
CaCl₂. 2H₂O	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
MgSO₄. 7H₂O	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
KH₂PO₄	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
KCl	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-
K₂SO₄	0,82	-	-	-	-	-	-	-	-

III. 4) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de fósforo (P)

As plântulas obtidas foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio MS modificado com diferentes composições de fósforo (0 mM; 0,15 mM; 0,30 mM; 0,60 mM; 1,25 mM - MS original; 2,5 mM; 3,75 mM; 5 mM; 7,5 mM; e 10 mM) (Tabela 2). Cada tratamento foi realizado com 20 frascos, totalizando 200 frascos, em cada frasco foram depositadas 10 plântulas que foram mantidas sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$

durante seis meses. Após três meses do início da transferência, as mesmas foram colocadas em novos meios de cultura com as mesmas concentrações, para garantir que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes do meio de cultura pelas plantas.

Tabela 2

Tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (0; 0,30; 0,60; 1,25; 2,5; 3,75; 5; 7,5; e 10 mM) do meio MS modificado.

Saís (g L ⁻¹)	Tratamentos (mM de P)									
	0	0,15	0,3	0,6	1,25	2,5	3,75	5	7,5	10
KNO₃	2,02	2,01	1,99	1,96	1,90	1,77	1,64	1,52	1,26	1,01
NH₄NO₃	1,60	1,61	1,61	1,62	1,65	1,70	1,75	1,80	1,90	2,00
CaCl₂. 2H₂O	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
MgSO₄. 7H₂O	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
KH₂PO₄	-	0,02	0,04	0,08	0,17	0,34	0,51	0,68	1,02	1,36

III. 5) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de potássio (K)

As plântulas obtidas foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio MS modificado com diferentes composições de potássio (0 mM; 1,875 mM; 2,5 mM; 5 mM; 10 mM; 20 mM - MS original; e 40 mM) (Tabela 3). Cada tratamento foi realizado com 20 frascos, totalizando 140 frascos, em cada frasco foram depositadas 10 plântulas que foram mantidas sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a temperatura de 26 $\pm$ 2 °C durante seis meses. Após três meses do início da transferência, as mesmas foram colocadas em novos meios de cultura com as mesmas concentrações, para garantir que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes do meio de cultura pelas plantas.

Tabela 3

Tratamentos com diferentes concentrações de potássio (0; 1,8575; 2,5; 5; 10; 20; e 40 mM) do meio MS modificado.

Sais (g L ⁻¹)	Tratamentos (mM de K)						
	0	1,875	2,5	5	10	20	40
KNO₃	-	0,63	0,13	0,38	0,89	1,90	3,92
NH₄NO₃	2,40	2,38	2,35	2,25	2,05	1,65	0,85
CaCl₂. 2H₂O	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
MgSO₄. 7H₂O	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
KH₂PO₄	-	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Ca₃(PO₄)₂	0,39	-	-	-	-	-	-

III. 6) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de cálcio (Ca)

As plântulas obtidas foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio MS modificado com diferentes composições de cálcio (0 mM; 0,75 mM; 1,5 mM; 3 mM - MS original; 4,5 mM e 6 mM) (Tabela 4).

Tabela 4

Tratamentos com diferentes concentrações de cálcio (0; 0,30; 0,60; 1,25; 2,5; 3,75; 5; 7,5; e 10 mM) do meio MS modificado.

Sais (g L ⁻¹)	Tratamentos (mM de Ca)					
	0	0,75	1,5	3	4,5	6
KNO₃	1,59	1,74	1,90	1,90	1,90	1,90
NH₄NO₃	1,77	1,71	1,65	1,65	1,53	1,41
CaCl₂. 2H₂O	0,00	0,11	0,22	0,44	0,44	0,44
MgSO₄. 7H₂O	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
KH₂PO₄	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Ca(NO₃)₂. 7H₂O	-	-	-	-	0,35	0,71
KCl	0,22	0,11	-	-	-	-

Cada tratamento foi realizado com 20 frascos, totalizando 120 frascos, em cada frasco foram depositadas 10 plântulas que foram mantidas sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a temperatura de

26±2 °C durante seis meses. Após três meses do início da transferência, as mesmas foram colocadas em novos meios de cultura com as mesmas concentrações, para garantir que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes do meio de cultura pelas plantas.

III. 7) Crescimento com as concentrações mais adequadas de N, P, K e Ca

As plântulas obtidas foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio MS modificado com as melhores concentrações dos tratamentos anteriores, considerando os balanços iônicos necessários, sendo elaborados quatro meios de cultura descritos na tabela 5 (T1, T2, T3 e T4). Cada tratamento foi realizado com 20 frascos, totalizando 80 frascos, em cada frasco foram depositadas 10 plântulas que foram mantidas sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a temperatura de 26±2 °C durante seis meses. Após três meses do início da transferência, as mesmas foram colocadas em novos meios de cultura com as mesmas concentrações, para garantir que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes do meio de cultura pelas plantas. Para comparação da eficiência deste meio, foram usados os meios MS, MS com 50% da concentração original de macronutrientes (MS/2) e MS com 20% da concentração original de macronutrientes (MS/5) (Tabela 5a e 5b).

Tabela 5a

Tratamentos com as concentrações mais adequadas de N, P, K e Ca do meio MS modificado.

Tratamentos	Nutrientes (mM)					
	N	P	K	Ca	Mg	S
T1	15	0,6	1,875	4,5	1,5	1,5
T2	15	0,6	2,5	4,5	1,5	1,5
T3	60	0,6	1,875	4,5	1,5	1,5
T4	60	0,6	2,5	4,5	1,5	1,5
MS	60	1,25	20	3	1,5	1,5
MS/2	30	0,6	10	1,5	0,75	0,75
MS/5	12	0,25	5	0,6	0,3	0,3

Tabela 5b

Tratamentos com as concentrações mais adequadas de N, P, K e Ca do meio MS modificado

Saís (g L ⁻¹)	Tratamentos						
	T1	T2	T3	T4	MS	MS/2	MS/5
KNO₃	0,12	0,19	0,12	0,19	1,9	0,95	0,38
NH₄NO₃	0,43	0,41	2,23	2,21	1,65	0,82	0,33
CaCl₂. 2H₂O	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
MgSO₄. 7H₂O	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
KH₂PO₄	0,08	0,08	0,08	0,08	0,17	0,08	0,03
Ca(NO₃)₂. 7H₂O	0,35	0,35	0,35	0,35	-	-	-

III. 8) Parâmetros avaliados**III. 8.1) Análise biométrica**

Nas análises biométricas foram avaliadas cerca de 20 plantas, coletadas ao acaso de cada um dos tratamentos. Foram avaliados a quantidade de raízes e folhas vivas e os comprimentos dos eixos caulinares (da base do caule até o ápice da maior folha) e radiculares (o comprimento da maior raiz) com o auxílio de régua milimétrica. Quando houve o aparecimento de plantas com multiplicação, estas foram descartadas das análises.

III. 8.2) Determinação de massa

Das plantas utilizadas para as análises biométricas, retiraram-se, ao acaso, cerca de 5 plantas provenientes dos tratamentos. As plantas foram separadas em duas partes, a aérea e radicular. 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. 8.3) Determinação do teor de clorofila e de carotenóides

O processo de extração de pigmentos fotossintéticos foi baseado em Lichtenthaler (1987), onde foram utilizados material vegetal em triplicatas proveniente de amostras compostas formadas a partir de 15 plantas, as quais foram picadas, misturadas e previamente armazenadas a -20 °C. Foram macerados 0,3 a 0,5 g de massa fresca de folhas em 3 mL de acetona gelada. As amostras foram filtrada em funis previamente forrados com papel de filtro umedecido com acetona gelada. Após todo o líquido ter sido filtrado, o papel de filtro foi lavado com acetona até o material depositado perder a coloração verde, sendo coletado em balões volumétricos de 25 ml, onde foi aferido com acetona pura até completar 25 mL. As

amostras foram armazenadas em geladeira em tubos de ensaio e tampadas com papel alumínio e filme de PVC transparente, até o momento da leitura em espectrofotômetro. A absorbância (*A*) da clorofila *a* foi lida em 661,6 nm, clorofila *b* em 644,8 nm e dos carotenóides em 470 nm. As concentrações da clorofila *a* (*Ca*), da clorofila *b* (*Cb*) e dos carotenóides (*C*) foram obtidas pelas equações apresentadas a seguir:

$$Ca = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}$$

$$Cb = 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6}$$

$$C = (1000 A_{470} - 1,90 Ca - 63,14 Cb) / 214$$

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

III. 8.4) Análise da concentração endógena de elementos minerais

As análises dos elementos minerais foram realizadas com as massas secas da parte aérea de 180 plantas de cada um dos tratamentos, sendo as massas secas obtidas em estufa de ar forçado a 60 °C e pulverizadas em moinho de bola. Os teores de macro e micronutrientes foram determinados em triplicatas ou duplicatas de 0,5 a 1,0 g em cada tratamento, conforme a quantidade de massa seca, segundo metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997), no laboratório de química analítica do Departamento de Solos e Nutrição Mineral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade São Paulo. Resumidamente, para determinação de N, as amostras foram submetidas a uma digestão-sulfúrica. Para o K, enxofre (S), Ca, magnésio (Mg), P e os micronutrientes cobre (Cu) e manganês (Mn), ferro (Fe) e zinco (Zn), as amostras foram submetidos à digestão nítrico-perclórica. Para o boro (B), as amostras foram incineradas. Após a digestão, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Fe e Zn foram determinados em espectrometria de absorção atômica. Para a determinação de S foi utilizada a turbidimetria de bário e P e B por colorimetria.

III. 9) Delineamento estatístico

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 e comprimento das folhas) e de massa, tanto fresca quanto seca, de pigmentos fotossintéticos e da concentração endógena de elementos minerais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade.

IV) RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de nitrogênio (N)

Os resultados mostraram que as concentrações nitrogenadas escolhidas, de 0 mM a 175 mM de N, foram suficientes para se delimitar uma faixa de concentração favorável ao crescimento de *A. imperialis in vitro* por seis meses (Figura 2). Apenas as plantas crescidas na concentração 175 mM de N apresentaram alta taxa de mortalidade (70%) e as plantas mantidas em 30 mM de N tiveram 80% com formação de brotos, prejudicando as análises dos parâmetros, pois estas plantas foram descartadas. Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos.

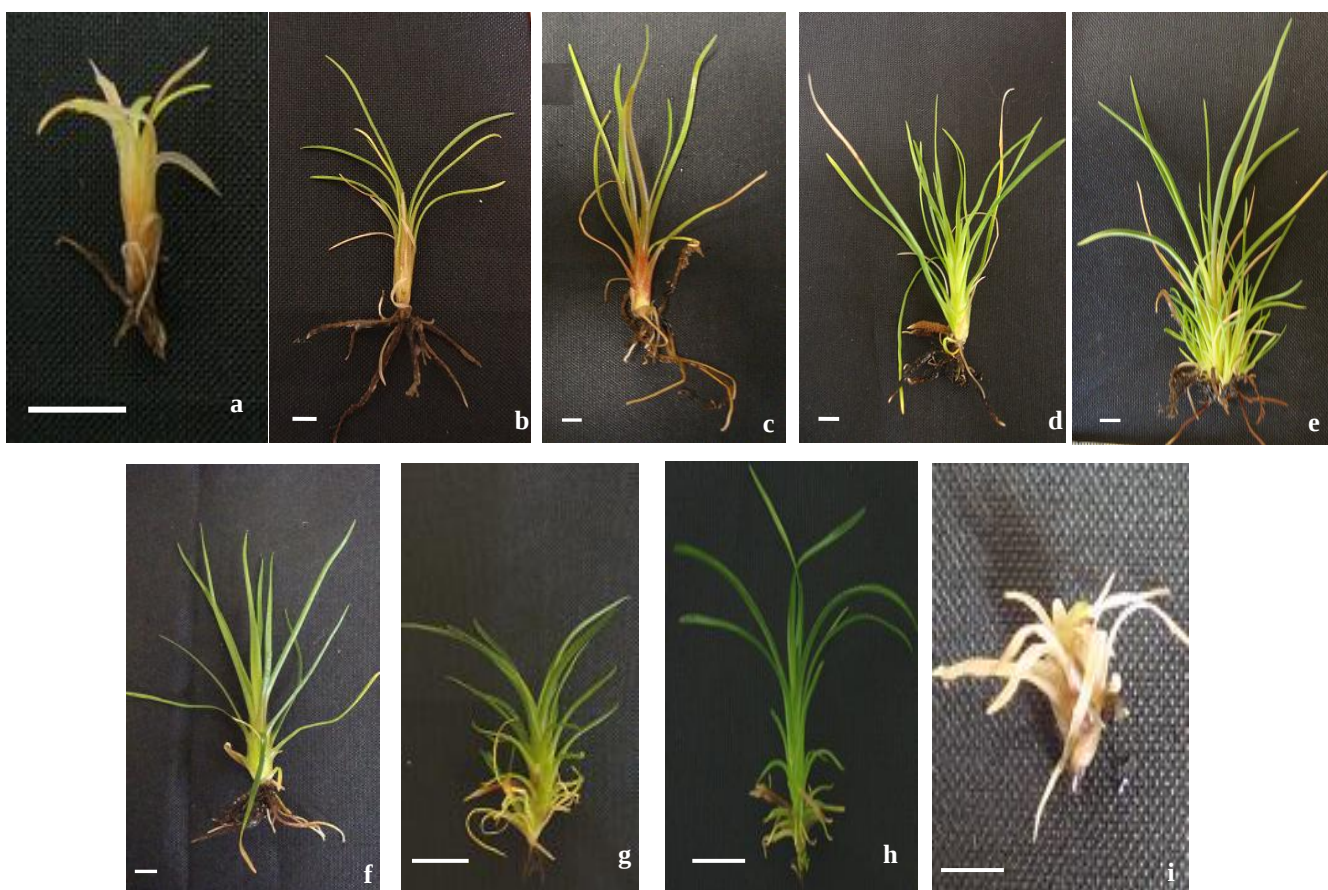


Figura 2: Aspectos das plantas de *A. imperialis* após 6 meses de crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de nitrogênio. (a) Plantas cultivadas em 0 mM de N. (b) Plantas cultivadas em 3,75 mM de N. (c) Plantas cultivadas em 7,5 mM de N. (d) Plantas cultivadas em 15 mM de N. (e) Plantas cultivadas em 30 mM de N. (f) Plantas cultivadas em 60 mM de N. (g) Plantas cultivadas em 90 mM de N. (h) Plantas cultivadas em 120 mM de N. (i) Plantas cultivadas em 175 mM de N. Barra = 1 cm.

Nas análises da parte aérea observou-se diferenças no número de folhas das plantas crescidas nos diferentes tratamentos, tendo ficado em torno de cinco folhas em cada planta cultivada na concentração de 0 mM de N aumentando gradativamente com o aumento da

fonte nitrogenada até possuir cerca de 25 folhas em 90 mM de N (Tabela 6) em seis meses de cultivo. Tal resultado foi observado em outra bromélia, a *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm., cultivada *in vitro* por 120 dias por Kanashiro *et al.* (2007) ao estudar o crescimento em diferentes concentrações de N ($7,5 \leq N \leq 120$ mM). Eles verificaram que o incremento da concentração de nitrogênio aumentou a quantidade de folhas, tendo aumentado de 5,71 folhas em 7,5 mM de N para 8,23 folhas em 120 mM de N. Estes mesmos autores mostram que provavelmente maiores concentrações de N proporcionaram a manutenção das folhas mais velhas por maior tempo nas plantas, diferentemente daquelas cultivadas nas concentrações menores, que retiraram nitrogênio das folhas mais velhas, causando senescência, e transportando para as folhas novas.

Com relação ao comprimento da parte aérea as menores plantas foram obtidas na concentração de 0 mM de N ($2,67 \pm 0,29$ cm), atingindo a altura de 8,59 cm em 60 mM, diminuindo em seguida nas concentrações de 90 e 120 mM ($4,35 \pm 0,58$ cm e $5,71 \pm 0,90$ cm, respectivamente) (Tabela 6). Grossi (2000) trabalhando com o cultivo *in vitro* da bromélia *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (epífita/rupícola) nas concentrações de 1,78, 7,5 e 30 mM de N do meio MS, observou que na concentração de 7,5 mM esta espécie apresentou maior crescimento em comprimento da parte aérea após cinco meses de cultivo. Este resultado difere do obtido para *A. imperialis*, que mesmo possuindo, também, o hábito rupícola, teve maior crescimento da parte aérea em concentrações maiores de N, como em 60 mM.

Em relação às massas, observou-se que a massa fresca (MF) da parte aérea foi significativamente maior de 7,5 mM de N até 90 mM de N, tendo a maior média em 60 mM de N (71 ± 35 mg) quando comparada as outras concentrações (Tabela 6). A massa seca (MS) da parte aérea foi maior nos tratamentos 7,5 mM de N (100 ± 60 mg), 15 mM de N (70 ± 20 mg) e 60 mM de N (50 ± 10 mg). As plantas crescidas na ausência de N não apresentaram mortalidade, mas tiveram as menores médias de massas fresca e seca (59 ± 5 mg e $7 \pm 0,7$ mg, respectivamente). Ao se observar a razão entre a MS/MF da parte aérea, na concentração 7,5 mM de N, as plantas apresentaram o maior valor, mostrando um maior acúmulo de biomassa. Kanashiro *et al.* (2007) ao estudar o crescimento da bromélia *A. blanchetiana*, cultivada *in vitro* por 120 dias em diferentes concentrações de nitrogênio ($7,5 \leq N \leq 120$ mM) verificaram que houve um decréscimo da massa fresca e seca da parte aérea com o incremento da concentração de nitrogênio, resultado oposto ao observado na espécie em estudo. Porém Dijik & Eck (1995), estudando o crescimento *in vitro* de três espécies de orquídeas, de mesmo gênero e hábito, por cinco meses, observaram comportamentos diferentes entre elas conforme o aumento de fornecimento de N no meio (de 0 a 12 mM de N), sendo que a produção de biomassa diminuiu em *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó, aumentou em *D. praetermissa*

(Druce) Soó e se manteve estável em *D. majalis* (Rchb. f.) P.F. Hunt & Summerh. Assim, pode-se verificar que mesmo plantas de espécies diferentes, mas pertencentes ao mesmo gênero e de hábitos iguais, podem apresentar respostas diversas em relação ao incremento na adubação nitrogenada.

Tabela 6

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de nitrogênio. Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos (mM de N)							
	0	3,75	7,5	15	30	60	90	120
Número de folhas	5 d	10 c	12 c	13 b	13 b	14 b	25 a	15 b
Comprimento da parte aérea (cm)	2,67 f	6,70 c	8,05 a	6,95 bc	7,74 ab	8,59 a	4,35 e	5,71 d
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	59 c	167 b	440 ab	453 ab	370 ab	713 a	315 ab	254 b
Massa seca (MS) da parte aérea por planta (mg)	7 c	16 bc	100 a	70 a	28 b	50 ab	31 b	24 b
Razão MS/MF da parte aérea	0,12 b	0,10 b	0,23 a	0,15 b	0,07 c	0,07 c	0,10 b	0,10 b

Quanto aos resultados de pigmentos fotossintéticos, as análises de clorofilas mostraram um aumento gradual significativo de 7,5 mM de N até 120 mM de N, atingindo, nesta concentração, $0,69 \pm 0,06 \text{ mg.g}^{-1}$ MF de clorofila *a* e $0,31 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$ MF de clorofila *b*. As plantas cultivadas na concentração de 0 mM apresentaram as menores quantidades de pigmentos, $0,100 \pm 0,002 \text{ mg.g}^{-1}$ FM de clorofila *a* e $0,040 \pm 0,008 \text{ mg.g}^{-1}$ MF de clorofila *b* (Figura 3).

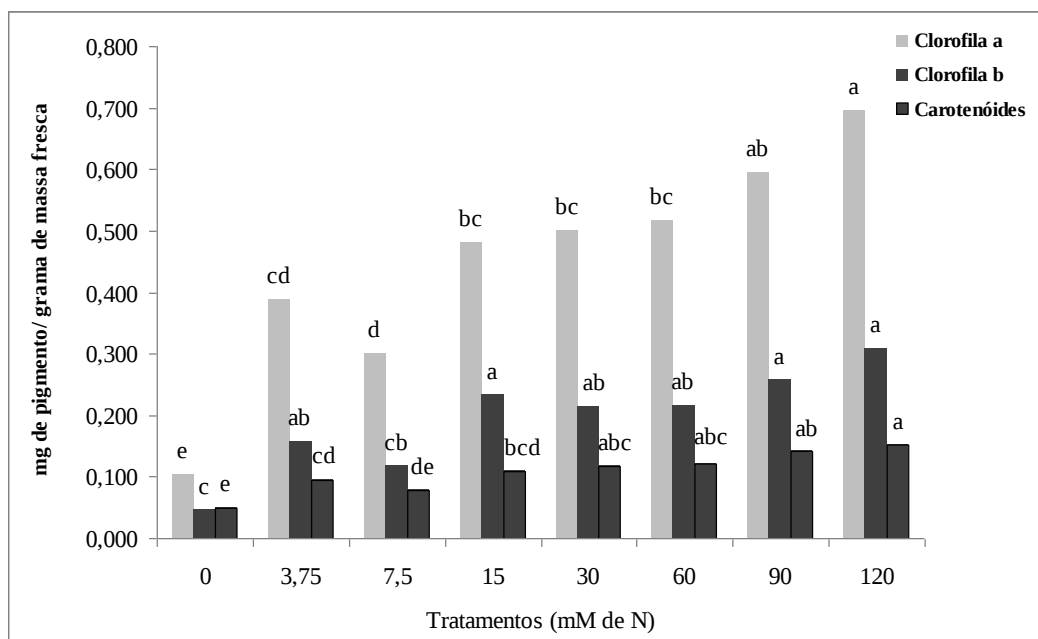


Figura 3: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo nas concentrações 0, 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 90 e 120 mM de nitrogênio. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Com relação a clorofila, para sua formação são necessários quatro átomos de nitrogênio sugerindo que esta molécula pode demonstrar o estado nitrogenado das plantas (Saleem *et al.* 2010, Taiz & Zeiger 2010). Em 7,5 mM de N as plantas de *A. imperialis* do presente trabalho apresentaram uma queda nas concentrações de clorofila *a* e *b* (Figura 3), isto pode ser explicado, provavelmente, pela presença de coloração rubra em 90% das plantas, e esta coloração deve-se, provavelmente pela presença de antocianinas que usam N na sua biosíntese, pois estes pigmentos derivam da fenilalanina (Shu & Xie 2010). Estes mesmos autores ao estudarem em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cultivadas em meios com diferentes concentrações de N observaram que conforme a concentração total de N era reduzida (9,4 mM de nitrato) aumentava a formação de antocianina, como foi observado neste trabalho com *A. imperialis*. Nas concentrações de 15 até 60 mM de N as plantas apresentaram teores de clorofilas semelhantes, aumentando até 120 mM de N (Figura 3). Tamaki *et al.* (2007) cultivaram plantas de *A. comosus*, a partir de nós de caule estiolado, em diferentes diluições de macronutrientes do meio MS (60 mM de N – MS, 30 mM de N – MS/2, 12 mM de N – MS/5, 6 mM de N – MS/10, 1 mM de N – MS/60 e 0,6 mM de N – MS/100), durante

90 dias. Os autores observaram que nos tratamentos MS, MS/2 e MS/5 não houve diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando que a quantidade de nitrogênio em MS/5 foi suficiente para o desenvolvimento normal da planta, resultado semelhante ao que ocorreu na bromélia em estudo *A. imperialis*. Esses autores mencionaram que os teores de clorofilas podem ser empregados como estimativa do conteúdo total de nitrogênio e consequentemente do estado nutricional da planta, fato corroborado por Saleem *et al.* (2010) e Agüera *et al.* (2010). Assim, o alto teor de clorofila *a* em 90 e 120 mM de N pode ser devido a maior quantidade de nitrogênio nesta concentração. Saleem *et al.* (2010) mostraram que conteúdo de clorofila foi aumentado de forma linear com o aumento das doses de N até 150 kg ha⁻¹, tanto em casa de vegetação quanto em campo, enquanto os índices de área foliar continuaram a aumentar até a maior taxa de aplicação (200 kg N ha⁻¹). Assim o aumento na concentração de N fornecido para a planta pode aumentar a sua capacidade fotossintética (Hikosaka & Osone 2009). Além disso, este aumento na concentração de clorofila pode ser explicado por Rubio *et al.* (2009), que relacionaram nutrição de plantas com hormônios, nesta revisão eles observaram que a citocinina é um mensageiro de longa distância quando há um aumento do nitrato nas raízes, este hormônio é transportado para a parte aérea e induz maior produção de clorofila.

Em relação a parte radicular os resultados obtidos para a variável comprimento da raiz, mostraram que em 0, 90 e 120 mM de N as raízes foram menores (1,05±0,70 cm, 0,80±0,35 cm e 1,13±0,71 cm, respectivamente), em 7,5 mM de N foram maiores (5,80±0,87 cm) (Tabela 7) e em 3,75 mM de N as plantas apresentaram raízes mais finas (dados não mostrados). Garnetti *et al.* (2009), no seu trabalho de revisão sobre o nitrogênio e seu efeito sobre as raízes, mencionaram que o crescimento radicular em altas concentrações de N é reduzido, tal como foi observado neste trabalho. Provavelmente, esse crescimento reduzido nos tratamentos de 90 e 120 mM de N, deve-se a um certo grau de toxidez para a planta quando submetida a estas concentrações (Taiz & Zeiger 2010), visto que trata-se de uma espécie rupícola adaptada à baixa disponibilidade de nutrientes. Em uma situação de baixa disponibilidade de N, o crescimento radicular é maior, como mostram Bonifas & Lindquist (2009) ao estudarem o efeito do fornecimento de N na morfologia de raízes de milho e de abútua (*Chondodendron platyphyllum* (Saint-Hilaire) Miers), com a diminuição da oferta de N, o abútua pode mudar sua morfologia radicular mais do que a do milho, investindo uma parcela maior de sua biomassa para a produção de raízes finas. Raízes finas são importantes porque são os principais caminhos para a absorção de nutrientes na planta e porque eles entram em contato com o maior volume de solo. Raízes finas também são um componente importante do solo, sendo que as plantas com raízes mais longas e vigorosas raízes laterais

terão uma maior área de contato com o substrato e, portanto, um elevado potencial para absorver os nutrientes (Zhang *et al.* 2010).

O maior crescimento das raízes em baixas concentrações de N pode ser explicado por Tamaki & Mercier (2007), que ao estudarem a sinalização entre parte aérea e radicular em plantas de *A. comosus* cultivadas *in vitro* sem o N, observaram nas raízes um acúmulo de auxina (IAA), sugerindo que este hormônio sinalize das folhas para as raízes a falta de N. Marschner (1995) e Davies (2010) mostraram que a auxina é uma das responsáveis pelo alongamento celular, e que as raízes são mais sensíveis a este hormônio, assim podendo induzir o alongamento das raízes em baixas concentrações de N. Assim, sob limitação de nitrogênio, o IAA pode fornecer o sinal que pode levar ao crescimento das raízes, o que provavelmente deve ter ocorrido com *A. imperialis* em baixas concentrações de N no presente trabalho.

Com relação aos resultados de massa fresca e seca radicular observou-se maior biomassa em 60 mM de N (108 ± 20 mg de MF e 10 ± 3 mg de MS), seguida de 7,5 mM de N (90 ± 10 mg de MF e 13 ± 2 mg de MS) (Tabela 7). Ao se observar a razão entre a massa seca e fresca das raízes, nas concentrações de 0 e 3,75 mM de N as plantas apresentaram os menores valores, sugerindo que as raízes estavam mais alongadas, com maior quantidade de água, corroborando com os resultados de comprimento radicular que foram maiores em baixas concentrações de N.

Em altas concentrações de N, como em 175 mM a maioria das plantas de *A. imperialis* não sobreviveu, sugerindo um grau de toxidez para a planta quando submetida a esta concentração. Segundo Taiz & Zeiger (2010), quando os minerais estão presentes em excesso no solo, este se torna salino e o crescimento das plantas, de um modo geral, é reduzido. No estresse salino a água é osmoticamente retida na solução salina, de forma que quanto maior a concentração dos sais a água se torna cada vez menos disponível, tendo os mesmos efeitos que o estresse hídrico por déficit, entre os efeitos está a redução no crescimento e na fotossíntese, devido ao fechamento dos estômatos (Taiz & Zeiger 2010). Segundo Benzing (2000), muitas bromélias nativas estão adaptadas a ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes, sendo possível supor que ocorra o mesmo com *A. imperialis* que é de hábito rupícola, pois os resultados sugerem que nas concentrações de 15 a 60 mM de N crescimento foi satisfatório *in vitro*, visto que 60 mM de N é a concentração do meio MS e é recomendada para o crescimento de outras espécies.

Tabela 7

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da raiz e razão da MS/MF de plantas *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de nitrogênio. Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos (mM de N)							
	0,00	3,75	7,50	15	30	60	90	120
Comprimento da raiz (cm)	1,05 c	2,96 b	5,08 a	2,24 b	2,05 b	2,95 b	0,80 c	1,13 c
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	20 ef	54 cd	90 ab	48	84	108	6	22
Massa seca (MS) da raiz por planta (mg)	2 d	6 cd	13 a	7 cd	10 bc	14 a	1 d	4 d
Razão MS/MF da raiz	0,100 c	0,110 bc	0,144 b	0,145 b	0,119 bc	0,129 b	0,166 a	0,181 a

Em relação à análise foliar de macronutrientes apenas foram feitas as análises nas plantas crescidas em 7,5, 15, 30 e 60 mM de N, pois nos demais tratamentos não foi possível a obtenção de massa seca suficiente. Os resultados mostraram com o incremento de N houve um aumento endógeno deste elemento, sendo a maior quantidade observada em 60 mM de N (Tabela 8), além disso, observou-se que dobrando a concentração de N (de 7,5 para 15; de 15 para 30; e de 30 para 60 mM de N) a concentração endógena de N aumentou em média 1,5 vezes.

Tamaki *et al.* (2007) cultivaram plantas de *A. comosus* em diferentes diluições de macronutrientes do meio MS (60 mM de N – MS, 30 mM de N – MS/2, 12 mM de N – MS/5, 6 mM de N – MS/10, 1 mM de N – MS/60 e 0,6 mM de N – MS/100), durante 90 dias e observaram que conforme a diluição aumentava os teores de nitrato diminuía, não sendo mais detectáveis em MS/60, mostrando que o meio mais concentrado possuía mais nitrato (fonte nitrogenada). Assim, em *A. imperialis*, o aumento da concentração de N endógeno foliar acompanhando o aumento exógeno de N pode estar relacionado ao N presente no nitrato, visto que a principal fonte nitrogenada utilizada foi o nitrato (Tabela 1).

A análise dos macronutrientes foliares sugeriu uma interferência do N sobre a quantidade de alguns macronutrientes como o P, o Ca e o S, pois eles tiveram as suas concentrações endógenas reduzidas conforme o incremento de N (Tabela 8), visto que a quantidade fornecida destes macronutrientes no meio de cultura foi a mesma em todos os tratamentos (Tabela 1). Em relação às concentrações endógenas foliares de P e de Ca, em 7,5 mM de N ($334,22 \pm 8,84$ µg de P/planta e $295,56 \pm 10,72$ µg de Ca/planta) e em 15 mM de N ($307,11 \pm 10,03$ µg de P /planta e $267,78 \pm 19,25$ µg de Ca /planta), a concentração destes dois macronutrientes se mantiveram maiores do que nas plantas cultivadas em 30 mM de N ($267,11 \pm 5,82$ µg de P /planta e $234,44 \pm 5,09$ µg de Ca /planta) e em 60 mM de N ($263,11 \pm 3,85$ µg de P /planta e $233,33 \pm 16,67$ µg de Ca /planta). Esta menor concentração endógena de P e Ca, nas folhas, em altas concentrações de N, pode ser explicada pela interação dos íons durante a absorção destes elementos (P e Ca), pois de acordo com Malavolta *et al.*, 1997 a absorção de um nutriente pode ser influenciada pela presença de outro nutriente, com isso sugere-se que o N, pode ter inibido a absorção de P e Ca e refletindo na concentração endógenas destes.

Com relação ao S nas plantas crescidas nas concentrações de 7,5 e 15 mM de N seus teores endógenos foram maiores ($198,82 \pm 5,67$ µg de S /planta e $240,02 \pm 4,44$ µg de S /planta, respectivamente) do que em 30 mM de N ($204,22 \pm 3,67$ µg de S /planta) e em 60 mM de N ($186,67 \pm 2,67$ µg de S / planta) (Tabela 8). Não foram relatados até o momento trabalhos relacionando a influência do N sobre os teores endógenos de S.

Experimento conduzido por Spironello *et al.* (2004) ao estudarem o cultivo de abacaxizeiro com diferentes doses de N ($0 \leq N \leq 70$ kgN/ha), observaram que o teor de P nas folhas decrescia com o aumento da dose de N. Este estudo corrobora com o presente trabalho, pois em *A.imperialis*, com o incremento da concentração de N, a quantidade endógena de P diminui.

Aranda-Peres *et al.* (2009) ao estudarem a importância do Ca no cultivo *in vitro* de três espécie de bromélias (*Vriesea friburgensis* Mez, *Vriesea hieroglyphica* (Carrière) E. Morren e *Vriesea unilateralis* (Baker) Mez), observaram com o incremento do Ca no meio de cultura, houve um aumento da concentração de N, porém há poucos trabalhos que relatam a influência do N na concentração endógena de Ca. Sarmiento *et al.* (1994), mostram que o aumento de NH_4NO_3 ($0 \leq N \leq 20$ mM) em plantas de oliveira, houve um aumento no teor de cálcio, não corroborando com o resultado deste estudo, que em *A. imperialis* houve uma diminuição na concentração de Ca quando a adubação nitrogenada foi aumentada.

Tabela 8

Concentrações de nutrientes (μg de nutriente/planta) em plantas de *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de nitrogênio. Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos (mM de N)	Macronutrientes (μg de nutriente/planta)					
	Nitrogênio (N)	Fósforo (P)	Potássio (K)	Cálcio (Ca)	Magnésio (Mg)	Enxofre (S)
7,5	700,22 d	334,22 a	3434,00 a	295,56 a	88,89 a	198,82 ab
15	1313,78 c	307,11 a	3230,00 a	267,78 a	84,44 a	240,02 a
30	2026,67 b	267,11 b	3094,00 a	234,44 b	73,33 a	204,22 b
60	3006,67 a	263,11 b	3026,00 a	233,33 b	68,89 a	186,67 c

A análise dos micronutrientes foliares sugeriu uma interferência do N sobre a quantidade de Cu, Mn e Zn (Tabela 9), visto que a quantidade fornecida destes micronutrientes no meio de cultura foi a mesma em todos os tratamentos (Tabela 1).

Em relação às concentrações endógenas foliares de Cu, em 7,5 mM de N ($0,14 \pm 0,03$ μg de Cu /planta) e 30 mM de N ($0,11 \pm 0,01$ μg de Cu /planta), as concentrações deste micronutriente foram maiores do que em 15 mM de N ($0,058 \pm 0,004$ μg de Cu /planta) e 60 mM de N ($0,044 \pm 0,019$ μg de Cu /planta) (Tabela 9). Com relação ao Mn, em 7,5 mM de N ($21,66 \pm 0,71$ μg de Mn /planta), a concentração deste nutriente foi maior quando comparado a 15 mM de N ($19,56 \pm 0,54$ μg de Mn /planta), sendo as menores concentrações encontradas nos tratamentos 30 mM de N ($17,13 \pm 0,13$ μg de Mn /planta) e 60 mM de N ($17,20 \pm 0,45$ μg de Mn /planta) (Tabela 9).

Com relação ao Zn, observou-se com o uso de 7,5 mM de N ($8,53 \pm 0,19$ μg de Zn /planta), 15 mM de N ($8,36 \pm 0,10$ μg de Zn /planta) e 60 mM de N ($8,01 \pm 0,18$ μg de Zn /planta) houve uma maior concentração endógena de Zn e uma menor nas plantas crescidas na concentração de 30 mM de N ($7,82 \pm 0,40$ μg de Zn/planta) (Tabela 9).

Experimento conduzido por Spironello *et al.* (2004) ao estudarem o cultivo de abacaxizeiro com diferentes doses de N ($0 \leq N \leq 70 \text{ kg N/ha}$), observaram que os teores endógenos de B, Cu, Fe e Zn não variaram significativamente com o incremento de N,

corroborando parcialmente com *A. imperialis*, pois apenas as concentrações endógenas de B e de Fe não alteraram.

Tabela 9

Concentrações de micronutrientes (μg de nutriente/planta) em plantas de *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de nitrogênio. Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos (mM de N)	Micronutrientes (μg de nutriente/planta)				
	Boro (B)	Cobre (Cu)	Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Zinco (Zn)
7,5	1,69 a	0,14 a	5,10 a	21,66 a	8,53 a
15	2,10 a	0,06 b	5,63 a	19,56 b	8,36 ab
30	1,69 a	0,11 a	5,14 a	17,13 c	7,82 b
60	1,92 a	0,04 b	5,05 a	17,20 c	8,01 ab

Conclui-se que 15 e 60 mM de N do meio MS modificado promoveram um aumento no crescimento *in vitro* de *A. imperialis*, e que este macronutriente (N) pode influenciar nos teores endógenos do P, do Ca, do S, do Cu, do Mn e do Zn.

IV.2) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de fósforo (P)

Os resultados mostraram que nas menores concentrações de P as plantas cresceram menos e a partir da concentração de 0,60 mM de P elas cresceram mais e apresentaram-se com aspecto mais vigoroso até 5 mM de P, depois, nas concentrações maiores, observou-se uma queda no crescimento. Cerca de 80% das plantas mantidas em 1,25 mM de N tiveram a formação de brotos. Em nenhuma das concentrações se observou mortalidade das plantas (Figura 4). Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos.

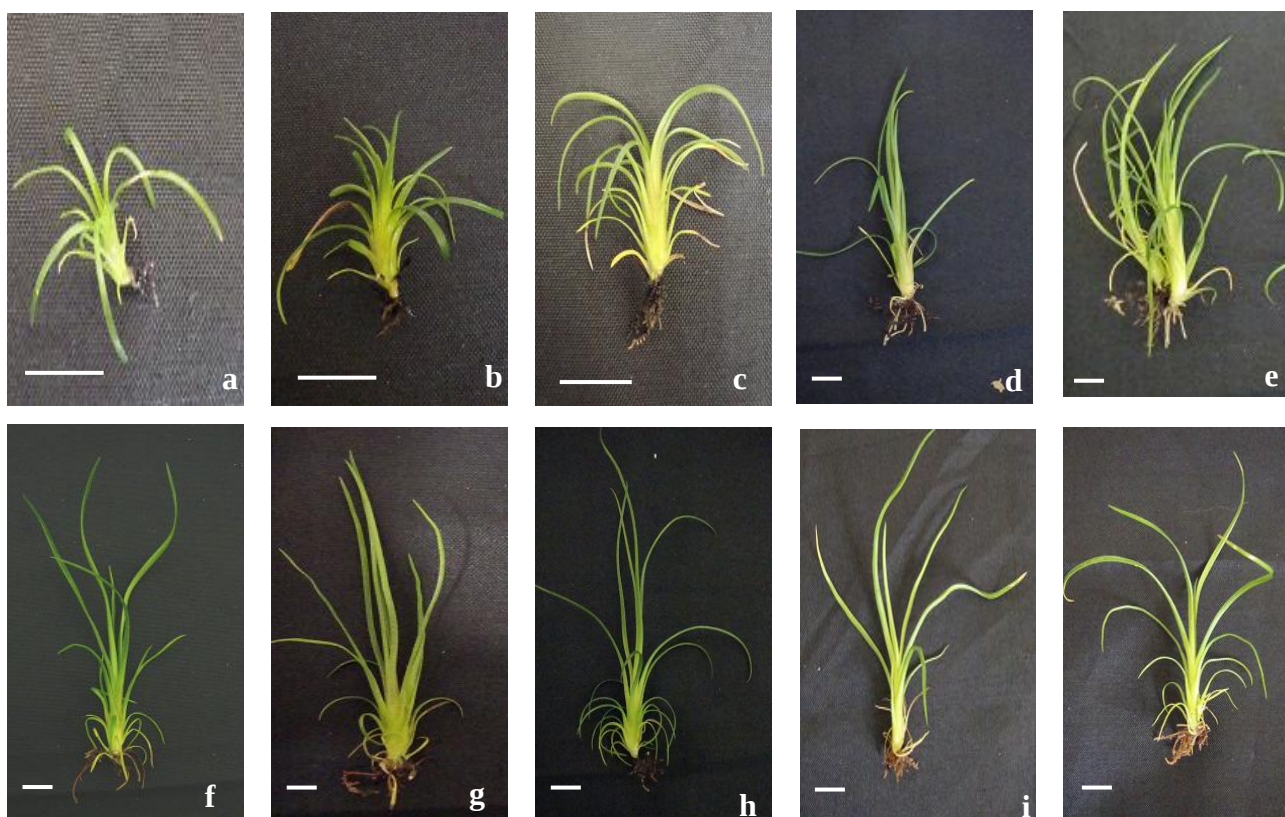


Figura 4: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de fósforo. (a) Plantas cultivadas em 0 mM de P. (b) Plantas cultivadas em 0,15 mM de P. (c) Plantas cultivadas em 0,30 mM de P. (d) Plantas cultivadas em 0,60 mM de P. (e) Plantas cultivadas em 1,25 mM de P. (f) Plantas cultivadas em 2,5 mM de P. (g) Plantas cultivadas em 3,75 mM de P. (h) Plantas cultivadas em 5 mM de P. (i) Plantas cultivadas em 7,5 mM de P. (j) Plantas cultivadas em 10 mM de P. Barra = 1 cm.

Nas análises da parte aérea observou-se um maior número de folhas em 0,15 mM de P ($16,81 \pm 3,95$) e menores em 0, 0,60 e 7,5 mM de P (Tabela 10). Esta maior quantidade de folhas em 0,15 mM de P pode estar relacionada com produção de etileno em baixa quantidade de P, pois Li *et al.* (2009), estudaram o efeito da deficiência do fósforo em plantas de *Medicago falcata* Lam. observaram que pouco fósforo havia um aumento na produção de etileno, e Santos (2009) observou, ao estudar o crescimento *in vitro* da bromélia *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch, que na presença de etileno, o número de folhas aumentava.

Com relação ao comprimento da parte aérea, as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas nas concentrações mais baixas (0, 0,15 e 0,30 mM de P), aumentando nos tratamentos com maiores concentrações até 3,75 mM de P, diminuindo nas concentrações posteriores. Ocorrendo apenas uma queda na concentração de 2,5 mM de P (Tabela 10).

Kanashiro (2005) ao estudar o efeito de diferentes concentrações de P na bromélia *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. (0,15<P<2,5mM) cultivadas *in vitro* não constatou diferenças entre os tratamentos em relação ao comprimento das folhas. Enquanto Russowski & Nicoloso (2003), ao trabalharem com *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, constataram que as plantas mantidas em 0,756 mM de P apresentaram maior comprimento da parte aérea, tendendo a diminuir com o aumento da concentração deste macronutrientes. Para Grant *et al.* (2001) a diminuição do comprimento da parte aérea em baixas concentrações de P pode estar relacionada a restrição na captação de carbono, pois eles observaram, que em cultivo de milho, a deficiência de P reduziu a taxa de emissão e crescimento das folhas, com redução da área foliar e consequentemente redução na captação de radiação solar, afetando o crescimento das raízes e diminuindo a capacidade de absorção de P pela planta.

Com relação a massa fresca e seca da parte aérea, os maiores valores ocorreram nas plantas dos tratamentos de 0,60, 1,25 e 3,75 mM de P, sendo os menores valores obtidos nas menores concentrações (0, 0,15 e 0,30 mM de P), porém em relação a razão massa seca e fresca observa-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 10).

De acordo com Prado (2008), em baixas concentrações de fósforo há uma diminuição no acúmulo de massa seca da parte aérea. Barben *et al.* (2010) ao estudarem o cultivo hidropônico de batata com diferentes concentrações de P (32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 2048 μ M de P), observaram que tanto em baixas (32 e 64 μ M) como elevadas (1024 e 2048 μ M) concentrações de P os sintomas de deficiência e excesso são os mesmos, entre esses sintomas está a diminuição da massa seca da parte aérea, como foi observado em *A. imperialis* neste trabalho.

Tabela 10

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de fósforo. Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos (mM de P)									
	0,00	0,15	0,30	0,60	1,25	2,50	3,75	5,00	7,50	10,00
Número de folhas	12 c	17 a	15 b	13 c	15 b	14 b	14 b	14 b	12 c	14 b
Comprimento da parte aérea (cm)	3,00 d	4,56 d	3,69 d	11,13 a	12,64 a	9,01 c	11,43 a	10,29 b	10,31 b	9,90 b
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	75 d	190 cd	143 cd	679 b	783 ab	312 c	1007 a	601 bc	538 bc	526 bc
Massa seca (MS) da parte aérea por planta (mg)	8 d	16 d	14 d	54 a	60 a	21 c	58 a	38 b	46 b	46 b
Razão MS/MF da parte aérea	0,11 a	0,08 ab	0,10 a	0,08 ab	0,08 ab	0,07 ab	0,06 ab	0,06 ab	0,08 ab	0,09 ab

Em relação à parte radicular os resultados obtidos para a variável comprimento da raiz mostraram que no tratamento 0,60 mM de P ($2,42 \pm 0,62$ cm) as plantas apresentaram maior comprimento de raiz. Nas concentrações menores (0, 0,15 e 0,30 mM de P) e em 3,75 mM de P, as raízes cresceram menos (Tabela 11). Segundo Epstein & Bloom (2006) pode ocorrer um adensamento de raízes com o aumento de fosfato, pois esse nutriente pode favorecer a multiplicação das raízes.

Para o parâmetro massa fresca e seca da raiz os tratamentos contendo 0,60 e 1,25 mM de P resultaram em plantas com maior quantidade de massa. Em 0, 0,15 e 0,30 mM de P, a quantidade de massa foi menor (Tabela 11). Os resultados obtidos corroboram com o dos encontrados por Russowski & Nicoloso (2003), que ao estudarem *P. glomerata*, constataram uma maior concentração de matéria seca da parte radicular na concentração com 1,07 mM de

P. No entanto, Kanashiro (2005), que ao trabalhar com *A. blanchetiana* ($0,15 \leq P \leq 2,5 \text{ mM}$), constatou um aumento linear da massa seca com o aumento do macronutriente. Para *A. imperialis* o incremento de P resultou em raízes mais compridas e não em um adensamento delas, isto é comprovado ao se observar a razão MS/MF da raiz, pois a partir da concentração 0,30 até 10 mM de P não houve diferenças estatísticas, mostrando que não houve um acúmulo de biomassa.

Tabela 11

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da raiz e razão da MS/MF de plantas *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de fósforo. Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos (mM de P)									
	0,00	0,15	0,30	0,60	1,25	2,50	3,75	5,00	7,50	10,00
Comprimento da raiz (cm)	0,52 d	1,08 b	0,80 cd	2,42 a	1,91 ab	1,38 b	1,06 bc	1,81 ab	1,70 ab	1,48 ab
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	3 c	11 c	8 c	89 a	105 a	69 b	80 b	86 b	78 b	82 b
Massa seca (MS) da raiz por planta (mg)	0,5 d	2 c	0,7 d	11 a	12 a	6 b	8 b	9 b	10 b	8 b
Razão MS/MF da raiz	0,17 a	0,18 a	0,09 b	0,12 b	0,11 b	0,09 b	0,10 b	0,10 b	0,13 b	0,10 b

A análise de pigmentos fotossintéticos mostrou que as plantas não apresentaram grandes diferenças nas concentrações de pigmentos entre os tratamentos, apenas em 10 mM de P houve uma queda nos teores de clorofila *a* (Figura 5).

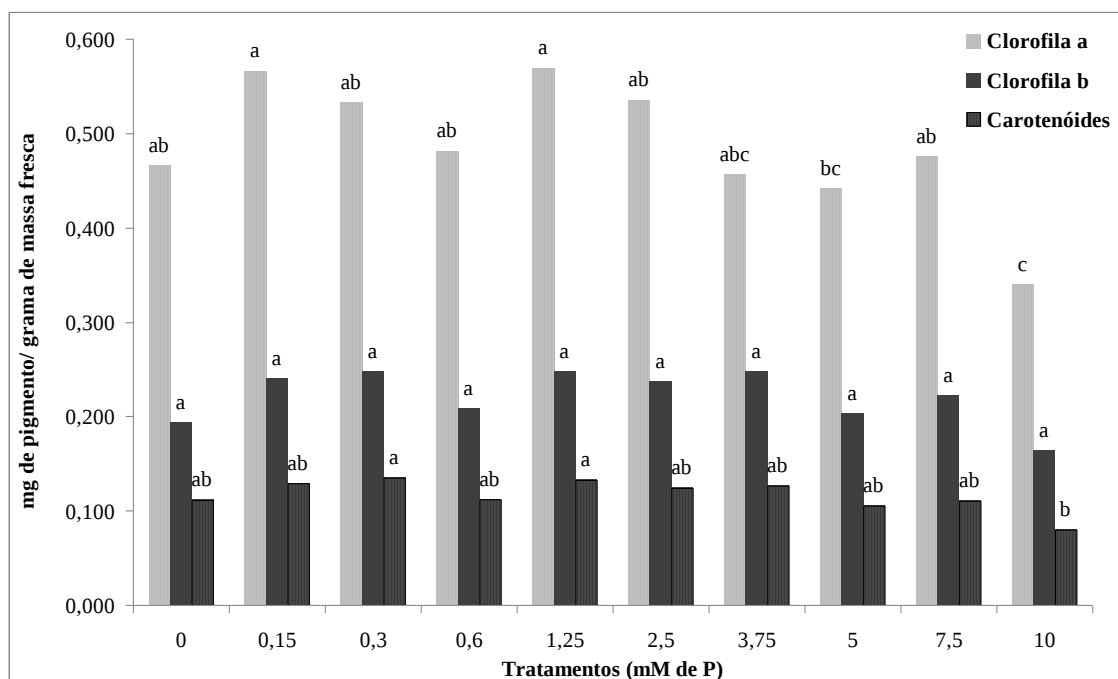


Figura 5: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenóides) de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo nas concentrações 0, 0,15, 0,30, 0,60, 1,25 2,5, 3,75, 5, 7,5 e 10 mM de fósforo. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Silva *et al.* (2010) ao estudarem o fornecimento de fósforo no cultivo do café, observaram quando em deficiência, ocorre uma diminuição nos teores de pigmentos fotossintéticos, prejudicando a captação de luz e assim a fotossíntese é menor, quando o P está em alta disponibilidade para as plantas, há um aumento dos pigmentos fotossintéticos e a fotossíntese é mais eficiente, o que não foi observado em *A. imperialis* no presente trabalho.

Com a análise dos resultados foi possível verificar que a alteração na concentração de P nos meios de cultura não afetou a quantidade de pigmentos fotossintéticos, mas observou-se uma variação nos parâmetros analisados em relação aos tratamentos, podendo sugerir um bom crescimento das plantas nas concentrações de 0,15 mM a 5 mM de P. Essa variação de resultados também foi encontrada por Schumacher *et al.* (2004) ao trabalhar com a influência de diferentes doses de P no crescimento de *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan (0, 90, 180, 270, 360, 450, 540 e 630 mg/kg de P). Segundo os autores, as concentrações utilizadas não determinaram eficiência máxima em uma única dose de P, obtendo-se os melhores resultados em 360 e 450 mg/kg de P. No entanto, para *A. imperialis*, as análises de todos os parâmetros sugerem que a melhor concentração para o cultivo *in vitro* desta espécie é de 0,60 mM de P.

Em relação à análise foliar de macronutrientes foram feitas as análises nas plantas crescidas em 0,60, 1,25, 2,5, 7,5 e 10 mM de P, nos demais tratamentos não foi possível a obtenção de massa seca suficiente. Pode-se observar que a concentração endógena foliar de P foi menor em 2,5 mM de P, seguida da 0,60 e 1,25 mM de P e as maiores concentrações

endógenas foram nos tratamentos de 7,5 e 10 mM de P (Tabela 12), vale lembrar que na concentração de 2,5 mM de P as plantas não se desenvolveram bem conforme mostrado na Tabela 10.

Prado (2008), ao estudar durante um ano o efeito de diferentes concentrações de fósforo ($0 \leq P \leq 450$ g de P_2O_5 /planta) em mangueiras, observou que o teor de P endógeno nas folhas manteve-se estável mesmo com o aumento da dose de P, o que foi observado em *A. imperialis* até 7,5 mM de P. Gunes & Inal (2009), ao estudarem a eficiência de absorção de P em dez cultivares de girassóis na ausência de P até alta concentração de P (100 mg.kg^{-1}), concluíram que as plantas se desenvolveram melhor nas menores concentrações de P, mostrando que estas cultivares possuem adaptações quando o P é reduzido, fato observado em *A. imperialis*, pois as plantas cultivadas de 0,60 a 1,25 mM de P tiveram os melhores crescimentos.

A análise dos macronutrientes foliares sugeriu uma interferência do P sobre a quantidade de quase todos os macronutrientes analisados, pois eles tiveram as suas concentrações endógenas reduzidas conforme o incremento de P, como ocorreu com o N e o Mg (Tabela 12), visto que as quantidades fornecidas destes macronutrientes no meio de cultura foram as mesmas em todos os tratamentos (Tabela 2). As concentrações endógenas foliares de N e Mg em 0,60 mM de P ($3047,56 \pm 220,62$ μg de N/planta e $62,22 \pm 10,18$ μg de Mg/planta) se mantiveram maiores em comparação aos outros tratamentos, 1,25 mM de P ($2513,96 \pm 56,89$ μg de N/planta e $42,92 \pm 1,44$ μg de Mg/planta), 7,5 mM de P ($1994,36 \pm 72,90$ μg de N/planta e $27,27 \pm 0,01$ μg de Mg/planta) e 10 mM de P ($1914,50 \pm 45,45$ μg de N/planta e $36,36 \pm 0,01$ μg de Mg/planta) e as menores concentrações endógenas de N e de Mg foram obtidas em 2,5 mM de P ($814,74 \pm 38,27$ μg de N/planta e $13,70 \pm 2,27$ μg de Mg/planta) (Tabela 12).

Com relação ao K endógeno, em 0,60 mM de P, 1,25 mM de P e 10 mM de P, as concentrações deste macronutriente se mantiveram maiores do que nas plantas cultivadas em 7,5 mM de P ($1234,32 \pm 123,10$ μg de K/planta) e 2,5 mM de P ($578,07 \pm 45,02$ μg de K/planta) (Tabela 12).

A concentração endógena de Ca foi maior nas plantas cultivadas em 0,60 mM de P ($275,56 \pm 11,71$ μg de K/planta) e menor nas plantas cultivadas em 10 mM de P ($115,91 \pm 3,21$ μg de K/planta), já nos demais tratamentos, as concentrações tiveram valores intermediários (Tabela 12).

Com relação ao S as concentrações endógenas nas plantas cultivadas em 0,60 mM de P ($156,67 \pm 4,06$ μg de S/planta), em 1,25 mM de P ($142,71 \pm 7,71$ μg de S/planta) e 7,5 mM de

P ($123,67 \pm 3,18$ μg de S/planta) se mantiveram maiores em comparação a 10 mM de P ($103,98 \pm 26,79$ μg de S/planta) e 2,5 mM de P ($51,04 \pm 3,28$ μg de S/planta) (Tabela 12).

Tabela 12

Concentrações de macronutrientes (μg de nutriente/planta) em plantas de *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de fósforo. Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos (mM de P)	Macronutrientes (μg de nutriente/planta)					
	Nitrogênio (N)	Fósforo(P)	Potássio(K)	Cálcio(Ca)	Magnésio(Mg)	Enxofre(S)
0,60	3047,56 a	137,78 b	1836,22 a	275,56 a	62,22 a	156,67 a
1,25	2513,96 b	178,96 b	1833,13,a	220,83 b	42,92 b	142,71 ab
2,50	814,74 d	80,96 c	578,07 c	76,30 c	13,70 d	51,04 c
7,50	1994,36 c	421,31 a	1234,32 b	86,36 c	27,27 c	123,67 ab
10,00	1914,50 c	469,04 a	1599,55 ab	115,91 b	36,36 c	103,98 b

São poucos os trabalhos relatados até o momento que mostram a influência do P nas concentrações de macronutrientes.

Silva *et al.* (2010) ao estudarem plantas de cafeeiro jovens em três condições de disponibilidade de P (sem adição de P ao solo (P-); com adição de 286 mg kg^{-1} de P_2O_5 (PA); e com o dobro da dosagem utilizada em PA (P+)) observaram com o incremento de P, os teores de N se reduziram, mostrando a interação antagônica destes dois elementos. Como foi observado em *A. imperialis*. Estes mesmos autores também observaram a interação entre P e Mg, pois com o aumento de P houve o incremento do teor foliar de Mg, não corroborando com os resultados obtidos com a espécie em estudo no presente trabalho.

Gunes & Inal (2009), ao estudarem a eficiência de absorção de P em dez cultivares de girassóis em duas condições, uma na ausência de P e outra em alta concentração de P (100 mg.kg^{-1}), observaram que a aplicação de P não causou efeito significativo na concentração de Ca endógeno na parte aérea, não corroborando com a espécie em estudo.

Pooler & Conover (1976) ao estudarem diferentes concentrações de P (25, 50 e 75 mg de P/vaso/mês) na bromélia *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, mostraram que o aumento de P exógeno não alterava significativamente os teores endógenos de N, K e Mg, mas diminuía a quantidade de Ca. Spironello *et al.* (2004) ao estudarem o cultivo de outra bromélia, o

abacaxizeiro, com diferentes doses de P ($0 \leq P \leq 320$ kg P/ha), observaram que o teor de S nas folhas se manteve constante com o aumento da dose de P, não corroborando com os resultados observados neste trabalho.

A análise dos micronutrientes foliares sugeriu uma interferência do P sobre a quantidade de todos os micronutrientes, pois eles tiveram as suas concentrações endógenas alteradas com o incremento de P (Tabela 13), visto que a quantidade fornecida destes micronutrientes no meio de cultura foi a mesma em todos os tratamentos (Tabela 2).

Em relação às concentrações endógenas foliares de B e Zn, em 0,60 mM de P ($1,66 \pm 0,37$ µg de B/planta e $3,03 \pm 0,12$ µg de Zn/planta) e em 1,25 mM de P ($1,77 \pm 0,05$ µg de B/planta e $3,07 \pm 0,10$ µg de Zn/planta), as concentrações destes micronutrientes se mantiveram maiores do que nas plantas cultivadas em 7,5 mM de P ($0,98 \pm 0,26$ µg de B/planta e $2,16 \pm 0,01$ µg de Zn/planta) e 10 mM de P ($1,16 \pm 0,11$ µg de B/planta e $2,48 \pm 0,08$ µg de Zn/planta) e os menores valores em 2,5 mM de P ($0,53 \pm 0,07$ µg de B/planta e $0,95 \pm 0,05$ µg de Zn/planta) (Tabela 13).

Com relação ao Cu, as plantas cultivadas em 0,60, 1,25 e 7,5 mM de P apresentaram as maiores concentrações endógenas deste elemento quando comparadas aos tratamentos de 2,5 e 10 mM de P (Tabela 13).

Com relação ao Fe, a maior concentração endógena foliar de Fe nas plantas foi com o uso de 7,5 mM de P ($10,26 \pm 7,84$ µg de Fe/planta) e a menor nas plantas crescidas na concentração de 2,5 mM de P ($0,89 \pm 0,04$ µg de Fe/planta) (Tabela 13).

A concentração endógena de Mn foi maior nas plantas cultivadas em 1,25 mM de P ($13,63 \pm 0,28$ µg de Mn/planta) e a menor concentração foi observada no tratamento de 2,5 mM de P ($4,11 \pm 0,03$ µg de Mn/planta) (Tabela 13).

Tabela 13

Concentrações de micronutrientes (μg de nutriente/planta) em plantas de *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de fósforo. Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos (mM de P)	Micronutrientes (μg de nutriente/planta)				
	Boro (B)	Cobre (Cu)	Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Zinco (Zn)
0,60	1,55 a	0,14 a	3,70 c	12,11 b	3,03 a
1,25	1,77 a	0,12 a	7,16 b	13,63 a	3,07 a
2,50	0,53 c	0,05 b	0,89 d	4,11 d	0,95 d
7,50	0,98 bc	0,13 a	10,26 a	7,72 c	2,16 c
10,00	1,16 b	0,07 b	3,59 c	8,55 c	2,48 b

Gunes & Inal (2009), ao estudarem a eficiência de absorção de P em dez cultivares de girassóis em duas condições, uma na ausência de P e outra em alta concentração de P (100 mg.kg^{-1}), mostraram com a aplicação de P, as concentrações de Fe e Zn decaíram, principalmente, na parte aérea, não corroborando com o que ocorreu em *A. imperialis*, estes mesmos autores também observaram que a concentração de Mn nas plantas variou de acordo com o cultivar utilizado.

Prado (2010), ao estudar o efeito de diferentes concentrações de P ($0 \leq P \leq 450 \text{ g P}_2\text{O}_5/\text{planta}$) em plantas de manga durante dois anos, observou que após o primeiro ano não houve alteração na concentração dos micronutrientes, exceto o Cu que aumentou e no segundo ano as plantas mostraram uma redução na concentração de Zn, após a aplicação das doses maiores de P, que pode ser devido ao P reduzir a translocação de Zn através da endoderme e epiderme da raiz, diminuindo sua absorção, o que pode ter ocorrido, também, com a *A. imperialis*.

Spironello *et al.* (2004) ao estudarem o cultivo de abacaxizeiro com diferentes doses de P ($0 \leq P \leq 320 \text{ kg P/ha}$), observaram que o teor de B nas folhas se manteve constante com o aumento da dose de P, não corroborando com os resultados observados neste trabalho.

Assim, de modo geral, conclui-se que 0,60 mM de P promoveu um melhor crescimento *in vitro* de *A. imperialis*, e que este macronutriente pode influenciar nos teores endógenos foliares dos macronutrientes N, K, Ca, Mg e S e também nos teores endógenos dos micronutrientes B, Cu, Fe, Mn e Zn.

IV.3) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de potássio (K)

Observou-se que apenas na concentração de 0 mM de K, as plantas apresentaram coloração mais clara que as demais, caracterizando o início de clorose e foi neste tratamento que houve morte das plantas, cerca de 26% (Figura 6). Na concentração de 40 mM de K, devido à alta taxa de multiplicação, não foi possível realizar a análise de nenhum dos parâmetros propostos (Figura 6h).

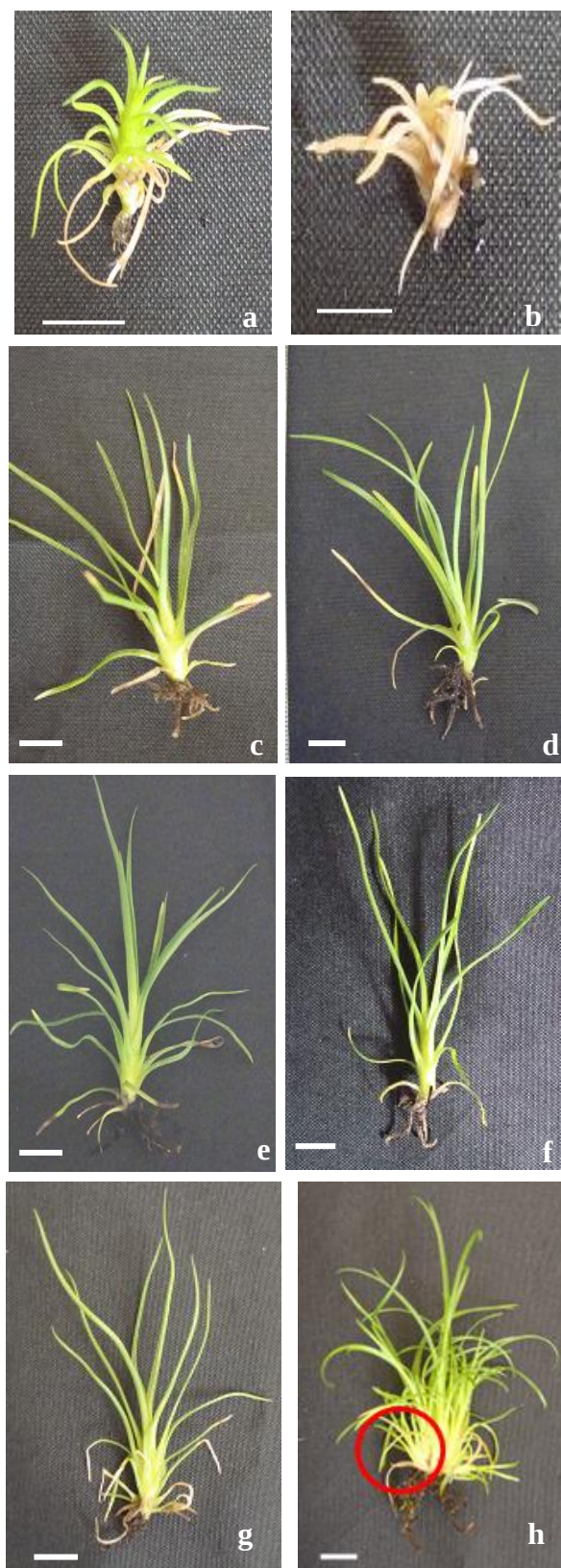


Figura 6: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de potássio. (a e b) Plantas cultivadas em 0 mM de K. (c) Plantas cultivadas em 1,875 mM de K. (d) Plantas cultivadas em 2,5 mM de K. (e) Plantas cultivadas em 5 mM de K. (f) Plantas cultivadas em 10 mM de K. (g) Plantas cultivadas em 20 mM de K. (h) Plantas cultivadas em 40 mM de K, em destaque a brotação. Barra = 1 cm.

Não se observou diferenças estatísticas no parâmetro número de folhas entre os tratamentos, porém no tratamento 0 mM de K ocorreu um maior número de folhas mortas ($9,60 \pm 3,12$) quando comparado aos demais tratamentos que em média apresentaram 6 folhas senescentes (Tabela 14). De acordo com Epstein & Bloom (2006) e Prado (2008), a deficiência de potássio é caracterizada pela necrose marginal ou necrose da folha inteira, como foi observado em *A. imperialis*.

Com relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 14), as menores folhas ocorreram nas plantas cultivadas na concentração de 0 mM de K ($1,83 \pm 0,82$ cm) e as maiores folhas em 5 mM de K ($8,89 \pm 0,83$ cm).). Em relação às massas fresca e seca observa-se que apenas as plantas crescidas em 0 mM de K tiveram os menores valores ($66 \pm 0,8$ mg de MF e $6 \pm 0,8$ mg de MS), porém ao se observar a razão entre a MS/MF não houve diferenças. Este pouco crescimento em 0 mM de K pode ser devido ao fato de este macronutriente ser um ativador de enzimas, e quando em deficiência tem-se a diminuição do metabolismo da planta e consequentemente a diminuição do crescimento (Prado, 2008).

Gerardeaux *et al.* (2010), estudaram o efeito de baixas concentrações de potássio (0,3; 0,07 e 0,02 mM de K) no desenvolvimento (mudanças na morfológicas e fisiológicas) de plantas de algodão e observaram que há uma redução no tamanho da folha de 62% no tratamento 0,02 mM de K após 50 dias do início do experimento, e esta deficiência de potássio afetou mais o tamanho da folha do que o número de folhas, isto também foi observado neste trabalho com *A. imperialis*.

Tabela 14

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de potássio. Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos (mM de K)					
	0	1,875	2,5	5	10	20
Número de folhas	14 a	14 a	13 a	14 a	13 a	16 a
Comprimento da parte aérea (cm)	1,83 c	6,68 c	7,20 c	8,89 a	8,07 b	8,37 ab
Massa fresca (MF) da parte aérea por planta (mg)	66 b	267 a	245 a	385 a	375 a	344 a
Massa seca (MS) da parte aérea por planta (mg)	6 b	28 a	26 a	36 a	32 a	43 a
Razão MS/MF da parte aérea	0,09 a	0,10 a	0,11 a	0,09 a	0,08 a	0,12 a

Nas análises dos pigmentos fotossintéticos (Figura 7), o maior valor foi observado nas plantas crescidas na concentração de 2,5 mM de K e a menor em 0 mM de K. Como na deficiência de potássio, a planta não se desenvolve bem e sugere-se apresentar vários processos metabólicos prejudicados, isto faz com que também não consiga absorver nutrientes necessários, como o nitrogênio, para a formação da clorofila. Prado (2008) observa também que há destruição dos cloroplastos com baixo fornecimento de K, que pode explicar a baixa quantidade de clorofila neste tratamento.

Kanashiro (2005) ao estudar o efeito de diferentes concentrações de potássio na bromélia *A. blanchetiana* (2,5<K<40mM) mostrou que conforme a concentração de potássio aumentava, o de magnésio diminuía. Prado (2008) diz que em excesso de K pode ocorrer indução de deficiência de outros nutrientes, como o magnésio, que é importante para a formação da clorofila. Com base nesses autores é possível concluir que a diminuição da

quantidade de pigmentos com o incremento de K pode ter sido influenciado pela diminuição de magnésio para as plantas.

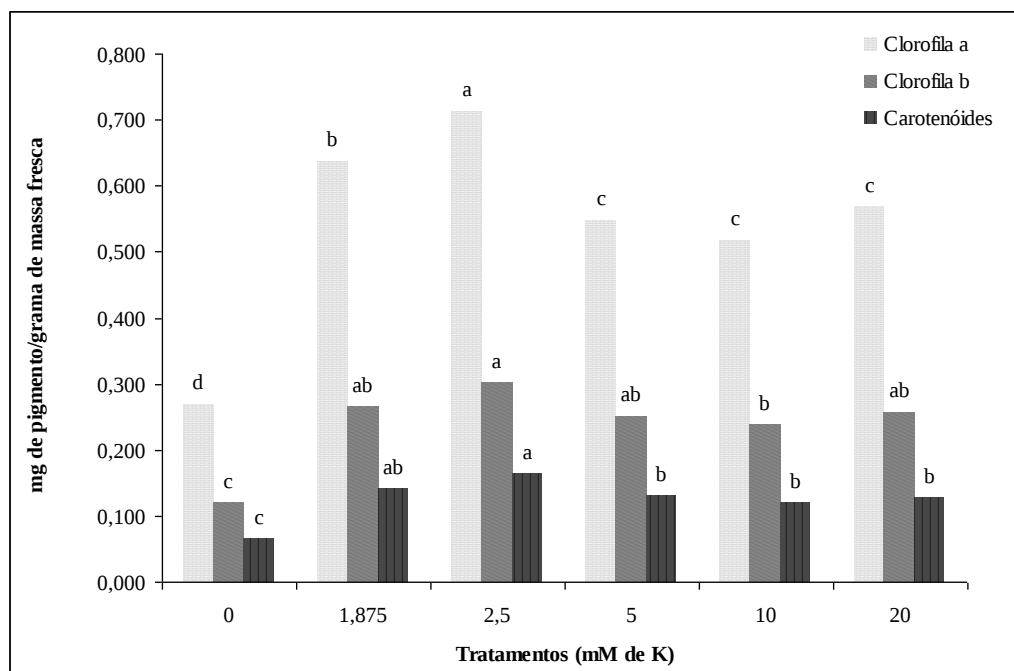


Figura 7: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenóides) de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo nas concentrações de 0, 1,875, 2,5, 5, 10 e 20 mM de potássio. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Quanto ao parâmetro comprimento da raiz (Tabela 15), apenas na concentração de 0 mM de K ($0,98 \pm 0,50$ cm) as plantas tiveram as menores raízes.

Kanashiro (2005) ao estudar o efeito de diferentes concentrações de K na bromélia *A. blanchetiana* ($2,5 < K < 40$ mM) sob cultivo *in vitro*, também obteve o mesmo resultado, isto é, conforme a concentração de potássio aumentava o comprimento da raiz também aumentava.

Em relação à massa fresca e seca da parte radicular (Tabela 15), na concentração de 0 mM de K as plantas apresentaram os menores valores (4 ± 1 mg de massa fresca e $0,5 \pm 0,1$ mg de massa seca da raiz), porém a razão entre MS/MF não apresentou diferenças, mostrando que apenas o crescimento foi afetado pela ausência de K.

Tabela 15

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da raiz e razão da MS/MF de plantas *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de potássio. Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos (mM de K)					
	0	1,875	2,5	5	10	20
Comprimento da raiz (cm)	0,98 b	1,70 a	1,77 a	1,71 a	1,68 a	1,63 a
Massa fresca (MF) da raiz por planta (mg)	4 b	40 a	40 a	58 a	51 a	45 a
Massa seca (MS) da raiz por planta (mg)	0,5 b	6 a	5 a	7a	7 a	5 a
Razão MS/MF da raiz	0,12 ^a	0,15a	0,12a	0,12a	0,14a	0,11a

Gerardeaux *et al.* (2010), encontraram resultados semelhantes em plantas de algodão, nas quais a massa seca total em baixa disponibilidade de K foi quase metade da quantidade existente nos tratamentos com maiores concentrações.

Em relação à análise foliar de macronutrientes e micronutrientes não foi possível fazer estas análises nas plantas crescidas nos tratamentos com diferentes concentrações de K, pois não foi possível a obtenção de massa seca suficiente, devido a perda de material por contaminação causada por bactérias, sendo que foi possível apenas realizar as análises biométricas, de massa e de pigmentos fotossintéticos.

Com a análise de todos os resultados relativos ao uso de diferentes concentrações de K, foi possível verificar que para todos os parâmetros analisados, a concentração de 0 mM de K foi prejudicial para o crescimento de *A. imperialis*. As concentrações de 1,875 a 2,5 mM de K mostraram-se eficientes para o crescimento *in vitro* desta espécie. A concentração de 40 mM de K, também, mostrou-se prejudicial para o desenvolvimento desta espécie, pois todas as plantas neste tratamento multiplicaram (apresentaram brotações), tal como ocorreu em 30 mM de N, podendo indicar uma situação de estresse abiótico para a planta.

IV.4) Crescimento das plantas em diferentes concentrações de cálcio (Ca)

Os resultados mostraram que as concentrações de cálcio escolhidas, de 0 mM a 6 mM de Ca, foram suficientes para se delimitar uma faixa de concentração favorável ao crescimento de *A. imperialis in vitro* por seis meses (Figura 8). Em nenhuma concentração houve mortalidade das plantas. Em quase todos os tratamentos, cerca de 80% das plantas apresentaram a formação de brotos, apenas as plantas crescidas em 4,5 mM de Ca não tiveram esta alta taxa de multiplicação. Além disto, as plantas crescidas em 4,5 mM e 6 mM de Ca eram mais rígidas, isto pode estar relacionado com o aumento do cálcio nestes dois tratamentos, pois de acordo com Prado (2008) este nutriente faz parte da formação da parede celular, incrementando a resistência mecânica dos tecidos, podendo favorecer a fase de aclimação das plantas. Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos.

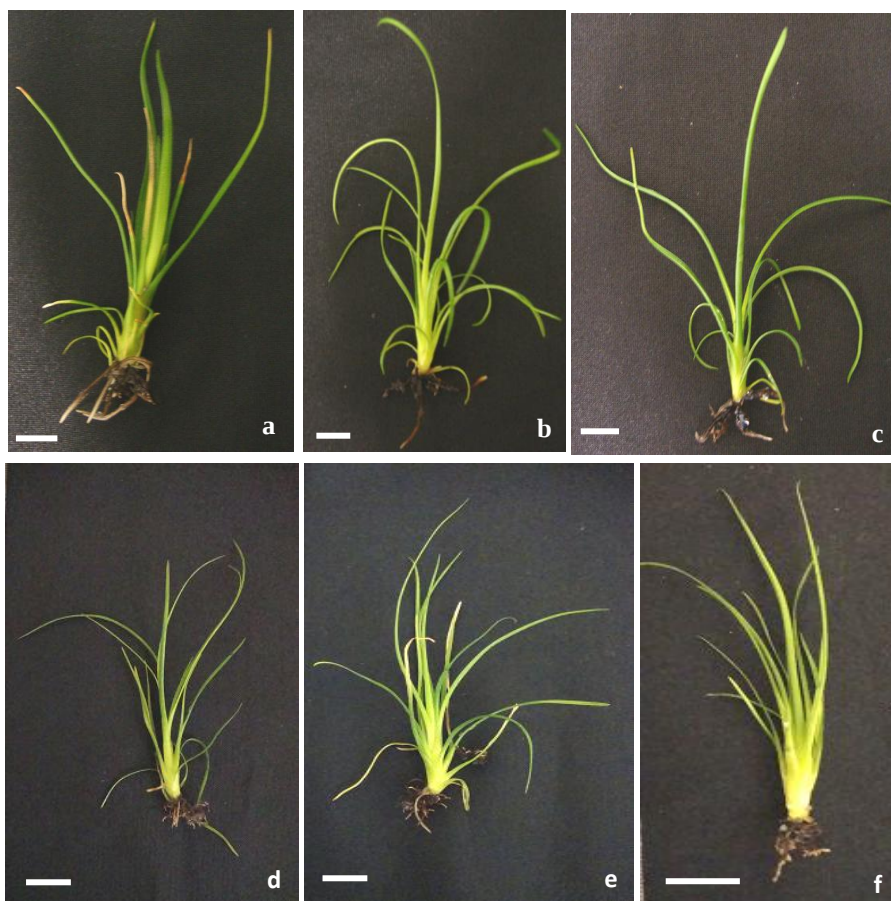


Figura 8: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo crescimento *in vitro* nos diferentes tratamentos de cálcio. (a) Plantas cultivadas em 0 mM de Ca. (b) Plantas cultivadas em 0,75 mM de Ca. (c) Plantas cultivadas em 1,5 mM de Ca. (d) Plantas cultivadas em 3 mM de Ca. (e) Plantas cultivadas em 4,5 mM de Ca. (f) Plantas cultivadas em 6 mM de Ca. Barra = 1 cm.

Nas análises da parte aérea não se observou diferenças no número de folhas das plantas crescidas nos diferentes tratamentos, tendo ficado em torno de 13 a 16 folhas para todos os tratamentos (Tabela 16) em seis meses de cultivo. Tal resultado foi observado em

outra bromélia, a *A. blanchetiana*, cultivada *in vitro* por 120 dias por Kanashiro *et al.* (2009) ao estudar o crescimento em diferentes concentrações de Ca ($1,5 \leq \text{Ca} \leq 12 \text{ mM}$). Eles verificaram que o incremento da concentração de cálcio não alterou, significativamente, o número de folhas.

Com relação ao comprimento da parte aérea as menores plantas foram obtidas na concentração de 6 mM de Ca ($6,71 \pm 1,12 \text{ cm}$), seguidas das concentrações de 0 mM de Ca ($8,47 \pm 1,22 \text{ cm}$), 0,75 mM de Ca ($8,10 \pm 1,43 \text{ cm}$) e 1,5 mM de Ca ($8,28 \pm 0,97 \text{ cm}$). As plantas cresceram mais nas concentrações de 3 mM de Ca ($10,31 \pm 1,81 \text{ cm}$) e 4,5 mM de Ca ($10,66 \pm 1,18 \text{ cm}$) (Tabela 16). Este comportamento pode ser explicado por Prado (2008), que em baixas ou altas concentrações de Ca, as plantas apresentam queda no crescimento, como foi observado em *A. imperialis*, que nas menores concentrações e na maior concentração não tiveram um bom desenvolvimento da parte aérea, porém Razzaque & Hanafi (2000) trabalhando com aplicação de cálcio em abacaxizeiro observaram que não houve diferença na altura das plantas com o incremento de Ca.

Em relação às massas, observou-se que a massa fresca (MF) da parte aérea foi significativamente maior em 3 mM de Ca até 6 mM de Ca, tendo a maior média em 4,5 mM de Ca ($630 \pm 200 \text{ mg}$) quando comparada as outras concentrações utilizadas (Tabela 16). A massa seca (MS) da parte aérea foi maior nos tratamentos 1,5 mM de Ca ($50 \pm 20 \text{ mg}$), 3 mM de Ca ($30 \pm 10 \text{ mg}$), 4,5 mM de N ($50 \pm 10 \text{ mg}$) e 6 mM de Ca ($40 \pm 10 \text{ mg}$). As plantas crescidas na ausência de Ca não apresentaram mortalidade, mas tiveram as menores médias de massas fresca e seca ($280 \pm 110 \text{ mg}$ e $20 \pm 10 \text{ mg}$, respectivamente). O maior valor da razão entre MS/MF foi nas plantas crescidas em 1,5 mM de Ca (Tabela 16). Kanashiro *et al.* (2009) ao estudar o crescimento da bromélia *A. blanchetiana*, cultivada *in vitro* por 120 dias em diferentes concentrações de cálcio ($1,5 \leq \text{Ca} \leq 12 \text{ mM}$) verificaram que houve um aumento da massa fresca das folhas com o incremento da concentração de cálcio até a concentração de 9,34 mM de Ca, decrescendo a partir deste ponto, resultado semelhante ao observado na espécie em estudo. Porém, estes mesmos autores não observaram diferenças na massa seca da parte aérea com o incremento de cálcio, porém Aranda-Peres *et al.* (2009) cultivaram *in vitro* as bromélias *V. hieroglyphica*, *V. friburguenses* e *V. unilateralis* (bromélias epífitas) em meios com diferentes concentrações de cálcio (1,5, 3, 6 e 12 mM de Ca) e constataram que as plantas que apresentaram maior crescimento e maior acúmulo de biomassa fresca e seca foram as cultivadas no meio com 12 mM de Ca (quantidade quatro vezes maior do que a presente no MS completo). Estes mesmos autores observam que este aumento no crescimento e na biomassa, pode ser atribuído a complementação de Ca, que é um importante sinalizador,

que mantém a integridade das membranas e com isso auxilia na retenção de nutrientes para o crescimento das plantas.

Tabela 16

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da parte aérea de plantas *Alcantarea*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de cálcio. Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos (mM de Ca)					
	0	0,75	1,5	3	4,5	6
Número de folhas	14 a	14 a	13 a	14 a	14 a	16 a
Comprimento da parte aérea (cm)	8,47 b	8,10 b	8,28 b	10,31 a	10,66 a	6,71 c
Massa fresca da parte aérea por planta (mg)	277 b	259 b	259 b	548 a	627 a	430 ab
Massa seca da parte aérea por planta (mg)	22 b	18 b	49 a	35 ab	45 a	37 ab
Razão MS/MF da parte aérea	0,08 b	0,07 b	0,19 a	0,06 b	0,07 b	0,08 b

A análise de pigmentos fotossintéticos mostrou que as plantas não apresentaram diferenças nas concentrações de pigmentos entre os tratamentos (Figura 9).

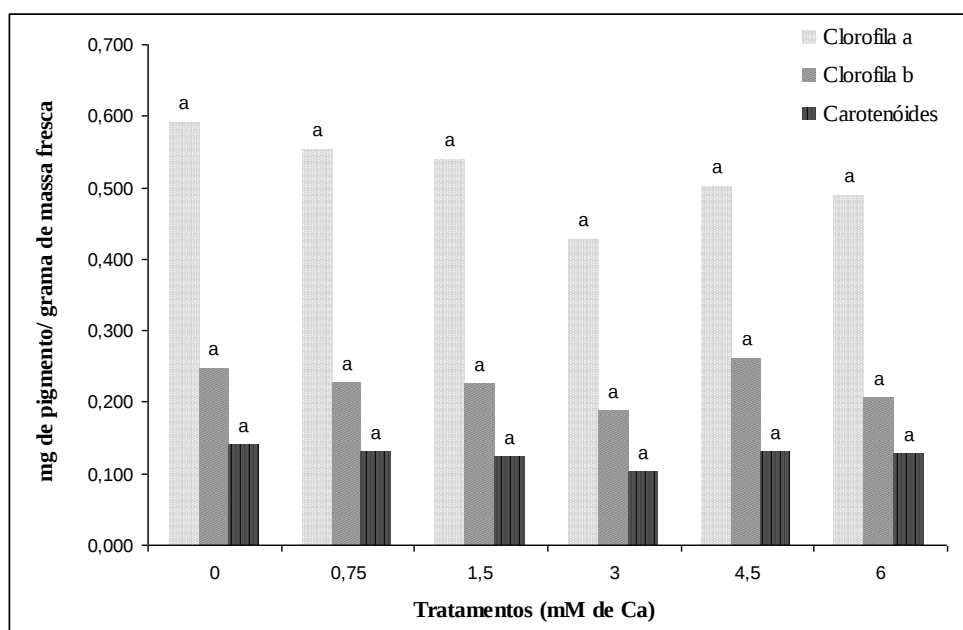


Figura 9: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenóides) de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo nas concentrações 0; 0,75; 1,5; 3; 4,5; e 6 mM de cálcio. Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Prado (2008) relata que plantas de *Coffea arabica* L. sob condições de deficiência de Ca apresentavam redução no nível de clorofila e de proteínas solúveis, isto pode ser explicado por Taiz & Zeiger (2010) que mostram que em tecidos deficientes em Ca o prejuízo da integridade da membrana leva ao aumento na velocidade da respiração e na degradação líquida de proteínas e clorofila, fato não observado nas análises de pigmentos em *A. imperialis*. Porém no tratamento 0 mM de Ca, os sintomas de deficiência já estavam aparecendo, como clorose internerval nas folhas mais novas e as folhas mais velhas eram quebradiças e se despendiam com facilidade (sintomas descritos por Prado, 2008 e Miranda *et al.*, 2010).

Em relação a parte radicular os resultados obtidos para a variável comprimento da raiz, mostraram que em 3 e 6 mM de Ca as raízes foram menores ($1,45 \pm 0,30$ cm e $1,36 \pm 0,26$ cm e $1,13 \pm 0,71$ cm, respectivamente), em comparação com os outros tratamentos (Tabela 17). O maior crescimento das raízes em 0, 0,75 e 1,5 mM de Ca pode ser explicado por Prado (2008), que mostra que nesta condição de baixa disponibilidade de cálcio há uma maior produção de etileno, que estimula a formação de raízes, sugerindo que isto possa ter ocorrido em *A. imperialis*.

Kanashiro *et al.* (2009), ao estudar o crescimento da bromélia *A. blanchetiana*, cultivada *in vitro* por 120 dias em diferentes concentrações de cálcio ($1,5 \leq \text{Ca} \leq 12 \text{ mM}$), verificaram que em 3 mM de Ca há uma queda no crescimento da raiz, devido ao aumento da concentração de cloro (Cl) neste tratamento, e posteriormente um aumento deste crescimento em 4,5 mM de Ca, pois mesmo com o aumento da concentração de Cl neste tratamento houve, também, um aumento de nitrato, que inibiu o efeito deletério do cloro, favorecendo o crescimento das plantas, porém, isto não ocorreu com *A. imperialis*, visto que a concentração de Cl foi igual para todos os tratamentos.

Com relação aos resultados de massa fresca radicular observou-se maior biomassa em 3 mM de Ca (122 ± 50 mg) quando comparada às outras. E os resultados de massa seca radicular mostram que as plantas crescidas em 0,75 mM de Ca tiveram as menores médias (4 ± 1 mg) (Tabela 17). Ao se observar a razão entre a massa seca e fresca das raízes, na concentração de 0,75 e 3 mM de Ca as plantas apresentaram os menores valores.

Tabela 17

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (mg) e massa seca (MS) (mg) da raiz e razão da MS/MF de plantas *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo em diferentes concentrações de cálcio. Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos (mM de Ca)					
	0	0,75	1,5	3	4,5	6
Comprimento da raiz (cm)	2,81 a	1,93 ab	1,71 ab	1,45 b	1,53 ab	1,36 b
Massa fresca da raiz por planta (mg)	40 b	41 b	43 b	122 a	51 b	42 b
Massa seca da raiz por planta (mg)	8 a	4 b	9 a	6 a	7 a	5 a
Razão MF/MS	0, 20 a	0,09 c	0,21 a	0,05 c	0,14 b	0,12 b

Em relação à análise foliar de macronutrientes e micronutrientes não foi possível fazer estas análises nas plantas crescidas nos tratamentos com diferentes concentrações de Ca, pois não foi possível a obtenção de massa seca suficiente, devido a perda de material por contaminação causada por bactérias, sendo que foi possível apenas realizar as análises biométricas, de massa e de pigmentos fotossintéticos.

Conclui-se que as concentrações de 3 a 4,5 mM de Ca no meio MS são favoráveis ao crescimento *in vitro* de *A. imperialis*, mas como na concentração de 3 mM de Ca houve uma alta taxa de formação de brotos, a concentração mais favorável foi a de 4,5 mM de Ca para o crescimento *in vitro* da espécie em estudo.

IV.5) Crescimento com as concentrações mais adequadas de N, P, K e Ca

A partir dos resultados anteriores, foram escolhidas as melhores concentrações de cada um dos macronutrientes estudados neste trabalho sendo elaborados quatro meios de cultura: (Tabela 5a e 5b).

Os resultados mostraram que todos os meios formulados a partir das melhores concentrações dos macronutrientes obtidos foram favoráveis para o crescimento de *A. imperialis*, pois em nenhum dos tratamentos houve mortalidade das plantas (Figura 10). Não foi possível determinar o número de raízes, pois estavam muito emaranhadas ou enoveladas em todas as plantas cultivadas em todos os tratamentos.

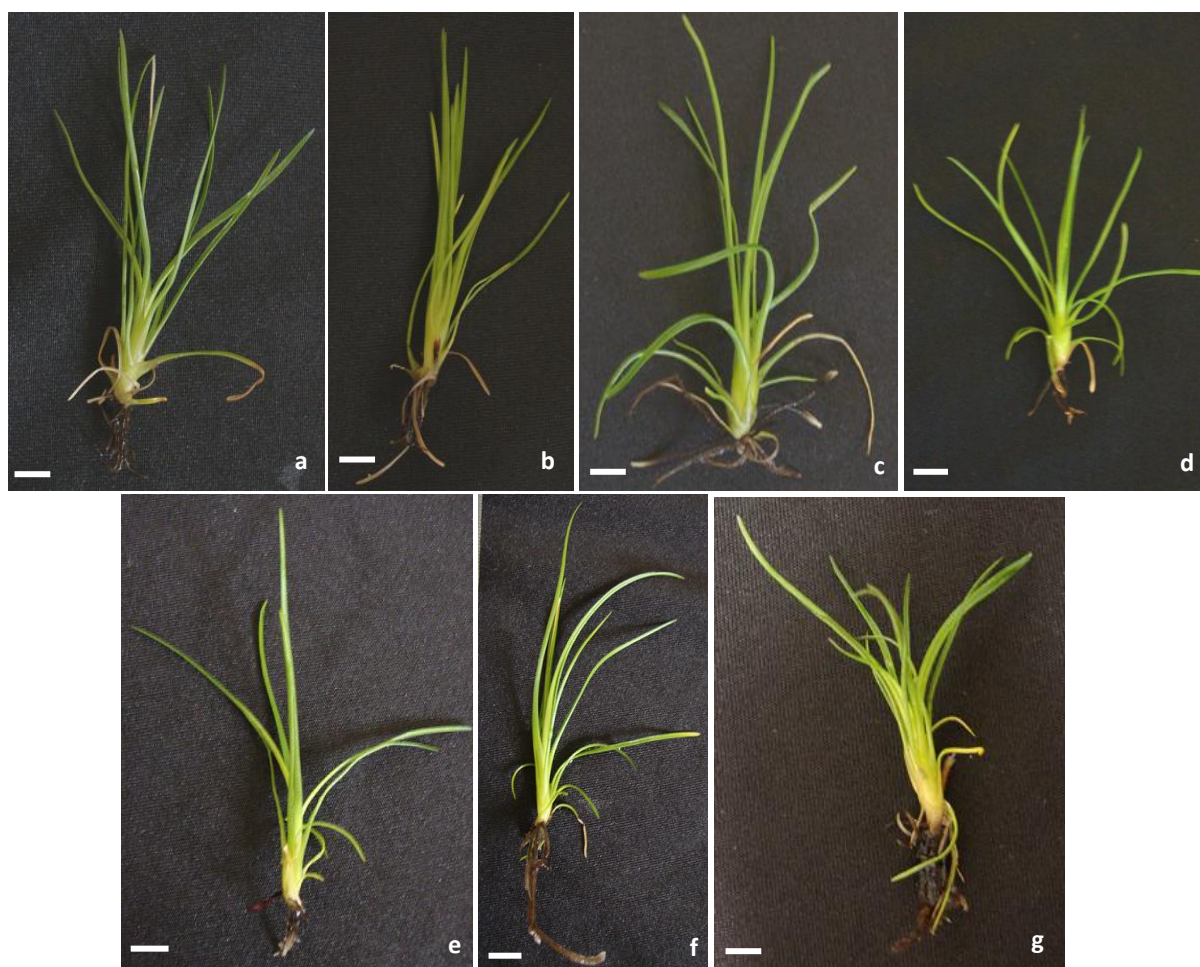


Figura 10: Aspectos das plantas de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo crescimento *in vitro* nos tratamentos com as melhores concentrações dos resultados anteriores (a) Plantas cultivadas em T1- 15 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca. (b) Plantas cultivadas em T2- 15 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca. (c) Plantas cultivadas em T3- 60 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca. (d) Plantas cultivadas em T4 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca. (e) Plantas cultivadas em MS completo. (f) Plantas cultivadas em MS com 50% dos macronutrientes (MS/2). (f) Plantas cultivadas em MS com 20% dos macronutrientes (MS/5). Barra = 1 cm

Nas análises da parte aérea observou-se um maior número de folhas nas plantas crescidas nos tratamentos T3($16,35 \pm 2,83$), T4($17,55 \pm 8,29$), MS($14,00 \pm 2,48$), MS/2($13,75 \pm 2,31$) e MS/5($13,47 \pm 2,10$), e menores em T1 ($12,05 \pm 1,96$) e T2 ($11,80 \pm 2,35$)

(Tabela 18). Os tratamentos T1 e T2 têm uma menor concentração de N, que de acordo com os resultados deste estudo, mostram com a diminuição do fornecimento de N, o número de folhas diminui.

Com relação ao comprimento da parte aérea, as maiores plantas ocorreram nos tratamentos T3 ($7,14 \pm 0,60$ cm), MS ($7,25 \pm 0,97$ cm) e MS/2 ($7,76 \pm 0,97$ cm), mostrando que no tratamento T3, as plantas cresceram semelhantes aos meios mais utilizados, como o MS e MS/2. O meio em que as plantas menos cresceram foi no MS/5 ($4,92 \pm 0,44$ cm) (Tabela 18).

Em relação às massas, observou-se que as plantas crescidas no tratamento T3 (377 ± 94 mg) e T4 (274 ± 56 mg) tinham as maiores massas fresca e no tratamento MS/5 (138 ± 28 mg) as plantas apresentaram as menores massas fresca, esta tendência não foi observada para a massa seca, pois apenas no meio T3 (113 ± 19 mg), as plantas apresentaram maior massa seca quando comparada aos outros tratamentos (Tabela 18). Em relação à razão MS/MF observou-se que o maior valor foi nas plantas crescidas em T3, cerca de 30% de acúmulo de biomassa, um valor bem maior em relação aos outros tratamentos.

Tabela 18

Número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da parte aérea de plantas *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo *in vitro* T1 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; T2 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca; T3 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; e T4 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca) e tratamentos comparativos ao MS completo, MS com 50% dos macronutrientes (MS/2) e MS com 20% dos macronutrientes do meio MS (MS/5). Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos						
	T1	T2	T3	T4	MS	MS/2	MS/5
Número de folhas	12 b	12 b	16 ab	18 a	14 ab	14 ab	13 ab
Comprimento da parte aérea (cm)	6,03 b	6,34 b	7,14 a	5,70 b	7,25 a	7,76 a	4,92 c
Massa fresca da parte aérea por planta (mg)	259 b	229 bc	377 a	274 ab	227 bc	266 b	138 c
Massa seca da parte aérea por planta (mg)	42 b	14 c	113 a	51 b	19 c	23 c	21 c
Razão MS/MF da parte aérea	0,16 b	0,06 c	0,30 a	0,19 b	0,08 c	0,09 c	0,15b

Com relação à análise dos pigmentos fotossintéticos, observa-se que as plantas crescidas em T3 ($0,65 \pm 0,06 \text{ mg.g}^{-1}$ FM de clorofila *a*) e T4 ($0,63 \pm 0,03 \text{ mg.g}^{-1}$ FM de clorofila *a*), apresentaram os maiores teores de clorofila *a* e observou-se que as plantas crescidas nos meios MS ($0,48 \pm 0,06 \text{ mg.g}^{-1}$ FM de clorofila *a*) e MS/5 ($0,46 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ FM de clorofila *a*) tinham os menores teores de clorofila *a* (Figura 11). Sugere-se que como o meio MS/5 é o mais diluído, não havia N suficiente para a produção de clorofila. Os tratamentos T3 e T4 tinham a mesma concentração que o MS, porém neste último houve uma brusca queda, pois sendo um meio muito concentrado pode ter ocorrido um estresse salino, que prejudicou a absorção de N e assim ocorrendo esta queda, fato não observado em T3 e T4, pois mesmo tendo a concentração de N igual a do MS, a concentração dos outros nutrientes é menor quando comparadas ao MS.

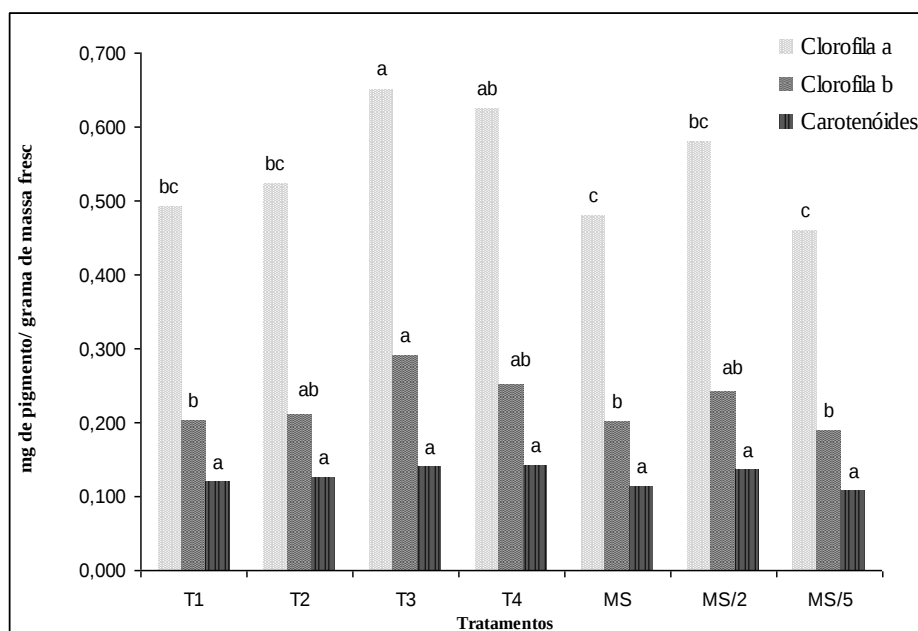


Figura 11: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) de *Alcantarea imperialis* após 6 meses de cultivo *in vitro* T1 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; T2 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca; T3 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; e T4 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca) e tratamentos comparativos ao MS completo, MS com 50% dos macronutrientes (MS/2) e MS com 20% dos macronutrientes do meio MS (MS/5). Letras diferentes indicam que os dados são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5 % de probabilidade para um mesmo pigmento.

Em relação à parte radicular os resultados obtidos para a variável comprimento da raiz mostraram que as raízes cresceram vigorosamente em todos os tratamento exceto no tratamento MS ($1,49 \pm 0,67 \text{ cm}$), isto pode ser devido a este meio possuir uma alta concentração de sais, prejudicando o desenvolvimento das raízes. Em relação às massas, observou-se maior biomassa nos tratamentos T3 ($67 \pm 12 \text{ mg}$ de MF e $8 \pm 3 \text{ mg}$ de MS) e MS/2 ($47 \pm 10 \text{ mg}$ de MF e $7 \pm 3 \text{ mg}$ de MS), tanto em relação à massa fresca quanto à seca das plantas (Tabela 19). Ao se observar a razão entre massa seca e fresca, no tratamento MS/ as

plantas apresentaram os menores valores, isto pode estar relacionado pois este meio é o mais diluído dentre os tratamentos utilizados, como se observar na Tabela 5b.

Tabela 19

Comprimento da raiz (cm), quantidades de massa fresca (MF) (g) e massa seca (MS) (g) da raiz e razão da MS/MF de plantas *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo *in vitro* em T1 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; T2 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca; T3 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; e T4 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca) e tratamentos comparativos ao MS completo, MS com 50% dos macronutrientes (MS/2) e MS com 20% dos macronutrientes do meio MS (MS/5). Letras comparam os valores na horizontal e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

	Tratamentos						
	T1	T2	T3	T4	MS	MS/2	MS/5
Comprimento da raiz (cm)	2,81 a	2,57 a	2,85 a	2,39 ab	1,49 b	2,82 a	2,96 a
Massa fresca da raiz por planta (mg)	31 bc	43 bc	67 a	32 bc	24 c	47 ab	41 bc
Massa seca da raiz por planta (mg)	4 bc	5 bc	8 a	4 bc	3 c	7 ab	3 c
Razão MS/MF da raiz	0,12 a	0,12 a	0,12 a	0,12 a	0,12 a	0,15 a	0,07 b

Em relação à análise foliar de macronutrientes pôde-se observar que as plantas crescidas em T3 tiveram as maiores concentrações endógenas de todos os macronutrientes (Tabela 20), provavelmente, o balanço iônico neste tratamento favoreceu a absorção de todos os macronutrientes analisados.

Com relação ao P, ao Ca, ao Mg e ao S endógenos os menores valores foram observados nas plantas crescidas em T2, MS e MS/2 (Tabela 20).

De modo geral, os meios MS e MS/2 não foram favoráveis para o crescimento *in vitro* de *A. imperialis*, talvez pelo fato destes meios apresentarem altas concentrações de sais dificultando o fluxo de água nas plantas e consequentemente prejudicando a entrada de macronutrientes nas plantas (Tabela 20), vale ressaltar que o K era o principal nutriente que

estava em maior concentração em MS e em MS/2 do que nos demais tratamentos. O tratamento T2, também, não se mostrou propício à entrada de macronutrientes em *A. imperialis* (Tabela 20).

Tabela 20

Concentrações de macronutrientes (μg de nutriente/planta) em plantas de *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo *in vitro* em T1 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; T2 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca; T3 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; e T4 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca) e tratamentos comparativos ao MS completo, MS com 50% dos macronutrientes (MS/2) e MS com 20% dos macronutrientes do meio MS (MS/5). Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos	Macronutrientes (μg de nutriente/planta)					
	Nitrogênio (N)	Fósforo (P)	Potássio (K)	Cálcio (Ca)	Magnésio (Mg)	Enxofre (S)
T1	1312,22 c	166,67 c	573,75 bc	313,89 b	61,11 b	189,44 c
T2	450,89 d	87,04 d	377,18 c	83,33 c	22,07 c	76,53 de
T3	6954,81 a	423,33 a	1360,37 a	544,44 a	148,15 a	489,63 a
T4	3140,00 b	222,17 b	727,00 b	259,17 b	60,00 b	231,50 b
MS	973,92 cd	96,34 d	553,33 bc	54,72 c	16,35 c	60,63 e
MS/2	954,82 cd	89,72 d	616,8 bc	60,85 c	20,16 c	78,50 de
MS/5	1312,22 c	166,67 c	573,75 bc	313,89 b	61,11 b	189,44 c

Em relação à análise foliar de micronutrientes foram feitas as análises apenas nas plantas crescidas nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, pois nos demais tratamentos não foi possível a obtenção de massa seca suficiente para as análises (Tabela 21).

Novamente, o T3 mostrou-se favorável ao crescimento *in vitro* de *A. imperialis*, ao se observar as quantidades endógenas foliares de micronutrientes nas plantas, pois neste tratamento as plantas apresentaram as maiores concentrações de B, de Cu, de Fe, de Mn e de

Zn (Tabela 21). E o T2 foi o tratamento menos adequado, pois as plantas crescidas neste meio apresentaram, de modo geral, as menores quantidades endógenas de micronutrientes analisados (Tabela 21), neste caso, parece que a baixa concentração de N no meio (15 mM de N) foi a responsável, além de possuir maior concentração de K do que T3.

Esta alta concentração endógena de nutrientes em T3 corrobora com os resultados de massa da parte aérea, pois foi neste tratamento que as plantas apresentaram maior porcentagem de biomassa (Tabela 18), sugerindo que estas plantas investiram a maior parte dos nutrientes na produção de biomassa na parte aérea.

Tabela 21

Concentrações de micronutrientes (μg de nutriente/planta) em plantas de *Alcantarea imperialis*, após seis meses de cultivo *in vitro* em T1 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; T2 - 15 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca; T3 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 mM de K e 4,5 mM de Ca; e T4 - 60 mM de N, 0,60 mM de P, 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca) e tratamentos comparativos ao MS completo, MS com 50% dos macronutrientes (MS/2) e MS com 20% dos macronutrientes do meio MS (MS/5). Letras comparam os valores na vertical e letras diferentes indicam que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos	Micronutrientes (μg de nutriente/planta)				
	Boro (B)	Cobre (Cu)	Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Zinco (Zn)
T1	0,72 ab	0,28 c	5,89 b	12,75 b	2,98 b
T2	0,26 b	0,06 d	2,07 c	4,63 c	1,02 c
T3	1,48 a	1,32 a	13,66 a	26,33 a	6,45 a
T4	1,21 ab	0,48 b	6,04 b	12,01 b	3,09 b

Diante dos resultados apresentados o meio T3 se mostrou mais eficiente na promoção do crescimento *in vitro* de *A. imperialis* do que os demais tratamentos, principalmente quando comparado ao meio mais utilizado, o MS, que foi um dos meios menos propícios para o crescimento de *A. imperialis*. Parece que altas concentrações de K (maiores do que 1,875 mM de K), mais do que baixas concentrações de N (menores do que 60 mM), são prejudiciais ao

crescimento de *A. imperialis*. De acordo com Halloran & Adelberg (2011), o MS pode não ser o mais sugerido para algumas espécies, sendo necessárias mudanças nesta formulação básica, e de acordo com os mesmos autores, são poucas as pesquisas nesta linha de trabalho.

V) CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que foi possível melhorar o crescimento *in vitro* de *A. imperialis* alterando-se as concentrações de alguns macronutrientes da formulação original de MS, meio mais utilizado no cultivo *in vitro*. Os resultados mostraram a importância de se fazer ajustes na composição mineral do meio de cultura de MS em relação ao N, ao P, ao K e ao Ca, pois as plantas cultivadas nos meios modificados cresceram mais do que as plantas cultivadas no meio MS. Sendo assim, pôde-se otimizar o crescimento *in vitro* de *A. imperialis*, diminuindo o tempo de crescimento e conseqüentemente o custo de produção, visto que o melhor meio foi mais diluído do que o MS completo.

As análises foliares de nutrientes endógenos mostraram que o N, o P, o K e o Ca podem interferir na absorção de outros nutrientes, tornando esta área interessante para se pesquisar, visto que são poucos os trabalhos sobre este assunto.

As plantas cultivadas na ausência de N, de P ou de Ca não morreram, somente as cultivadas por seis meses sem o K morreram.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho ficaram algumas perspectivas deste trabalho:

- cultivar *in vitro* a *A. imperialis* com diferentes concentrações de outros macronutrientes, o magnésio (Mg) e o enxofre (S);
- desenvolver trabalhos de aclimação das plantas produzidas;
- estudar mais sobre a interferência dos macronutrientes na absorção de outros nutrientes (macro e micronutrientes);
- analisar o que causa a pigmentação avermelhada nas folhas em apenas alguns tratamentos; e
- investigar o que induz a multiplicação das plantas em determinadas concentrações de macronutrientes, visto que é importante otimizar a sua micropropagação por tratar-se de uma espécie ameaçada de extinção e amplamente utilizada no paisagismo.

VI) RESUMO

A maioria dos representantes de Bromeliaceae é considerada ornamental, tornando-se alvo do extrativismo ilegal, como a bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, que está ameaçada de extinção de acordo com o Programa de Proteção das Espécies Ameaçadas de Extinção da Mata Atlântica Brasileira, da Fundação Biodiversitas, na categoria espécie em perigo de extinção. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta importante, pois possibilita a otimização do crescimento juntamente com os estudos nutricionais. O presente trabalho teve como objetivo estudar o crescimento de *A. imperialis* cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, visando a elaboração de um meio mais adequado para o crescimento desta planta. Neste estudo foram transferidas plântulas germinadas *in vitro* durante um mês, para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio Murashige & Skoog (MS) modificado com diferentes concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e cálcio (Ca). Cada tratamento possuía 20 frascos (10 plântulas/frasco), que foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a temperatura de 26 ± 2 °C durante seis meses. Foram determinados o número de folhas, os comprimentos dos eixos caulinares e radiculares, os teores de massas fresca e seca das partes aérea e radicular, além da quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides). Adicionalmente foram medidos os teores foliares endógenos de macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) e de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn), que foram realizados pelo laboratório de química analítica do Departamento de Solos e Nutrição Mineral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. Os resultados mostraram que as plantas cultivadas em 15 e 60 mM de N, 0,60 mM de P, 1,875 e 2,5 mM de K e 4,5 mM de Ca proporcionaram um bom crescimento *in vitro* desta espécie. Observou-se que as mudanças nas concentrações destes macronutrientes podem influenciar nos teores endógenos de outros nutrientes, mostrando a interação entre eles. Concluiu-se que ajustes nas concentrações de macronutrientes no meio de cultura de MS otimizam a produção desta espécie *in vitro*, pois de acordo com os resultados acima, o meio modificado se mostrou mais eficiente no crescimento desta espécie do que o meio MS completo, que é a formulação mais utilizada no cultivo *in vitro*.

Palavras-chaves: Bromeliaceae, conservação, nutrição mineral, micropropagação

VII) ABSTRACT

Most representatives of Bromeliaceae are considered ornamental, becoming the target of illegal extrativism, such as the bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, which is threatened with extinction according to the Program of Protection of Endangered Species of Brazilian Atlantic Forest, Biodiversity Foundation, the category of endangered species. The *in vitro* culture is an important tool because it enables the optimization of growth along with nutritional studies. This work aimed to study the growth of *A. imperialis in vitro* at different concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium in order to develop a better medium for growth of this plant. In this study, seedlings germinated *in vitro* after one month, were transferred for 250 mL vessels containing 40 mL of Murashige & Skoog (MS), with different concentrations of nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K) and calcium (Ca). Each treatment had 20 vessels (10 plantlets/vessels) were kept in culture room with a photoperiod of 12 hours with brightness of $30 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and temperature $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for six months. We determined the number of leaves, the lengths of shoot and root axes, the contents of fresh and dry weight of aerial parts and roots, plus the amount of photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, *b* and carotenoids). Additionally, we measured the levels of macronutrients (N, P, K, Ca and Mg) and micronutrients (B, Cu, Fe, Mn and Zn) that were performed by the analytical chemistry laboratory of the Departamento de Solos e Nutrição Mineral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, University São Paulo (USP). All data were subjected to statistical analysis. The results showed that plants grown in 15 and 60 mM N, 0.60 mM P, 1.875 and 2.5 mM K and 4.5 mM Ca provided a good *in vitro* growth of this species. It was observed that changes in concentration of these nutrients can influence endogenous levels of other nutrients, showing the interaction between them. It was concluded that adjustments in the culture medium optimize production of this species, because according to the above results, the modified medium was more efficient than MS medium, which is the formulation most often used *in vitro* growth.

Keywords: Bromeliaceae, conservation, mineral nutrition, micropropagation

VIII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguera, E., Purificación, C. & Purificación. de H.** 2010. Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. *Physiologia Plantarum* 138: 256–267.
- Aranda-Peres, A.N., Peres, L.E.P., Higashi, E.N. & Martinelli, A.P.** 2009. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the brazilian atlantic forest: the importance of calcium. *Hortscience* 44:106–112
- Barbara, 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. **Barbara, 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.
- Barben, S.A., Hopkins, B.G., Jolley, V.D., Webb, B.L. & Nichols, B.A.** 2010. Optimizing phosphorus and zinc concentrations in hydriponic chelator-buffered nutrient solution for Russet Burbank potato. *Journal of Plant Nutrition* 33:557–570.
- Benzing, D.H.** 1976. Bromeliad trichomes: structure, function, and ecological significance. *Selbyana* 1: 330-348.
- Benzing, D.H.** 1990. Vascular epiphytes. General biology and related biota. Cambridge University Press, Cambridge.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: profile of na adptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- 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.
- 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.
- Bonifas, K.D. & Lindquist, J.L.** 2009. Effects of nitrogen supply on the root morphology of corn and velvetleaf. *Journal of Plant Nutrition* 32:1371-1382.

- Brown, G.K. & Gilmartin, A.J.** 1989. Stigma type in Bromeliaceae – A systematic survey. *Systematic Botany* 14: 110-132.
- Carvalho, V.L.** 1997. Bromélias na Serra. *Bromelia* 4: 10-11.
- Davies, C.S.** 2000. Strategy differences of two potato species in response to nitrogen starvation. Do plants have a genetic switch for nitrogen signalling? *Plant, Cell and Environment* 23: 759-769.
- Davies, P.J.** 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. Ithaca Cornell University.
- Dijk E. & Eck, N.** 1995. Axenic *in vitro* nitrogen and phosphorus responses of some dutch marsh orchids. *New Phytologist* 131: 361–367
- Duran, S. & Monteiro, K.** 2001. Jardim de luxo sustenta tráfico de plantas. Disponível em: <http://www.biodiversityreporting.org/article.sub?docId=232&c=Brazil&cRef=Brazil&year=2001> (acessado em 21.07.2011).
- Engelmann, F.** 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57: 227-243
- Epstein, E. & Bloom, A.J.** 2006. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Ed. Planta, Londrina.
- 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.
- Forzza, R.C.; Leitman, P.M.; Costa, A.F.; Carvalho Jr., A.A.; Peixoto, A.L.; Walter, B.M.T.; Bicudo, C.; Zappi, D.; Costa, D.P.; Lleras, E.; Martinelli, G.; Lima, H.C.; Prado, J.; Stehmann, J.R.; Baumgratz, J.F.A.; Pirani, J.R.; Sylvestre, L.; Maia, L.C.; Lohmann, L.G.; Queiroz, L.P.; Silveira, M.; Coelho, M.N.; Mamede, M.C.; Bastos, M.N.C.; Morim, M.P.; Barbosa, M.R.; Menezes, M.; Hopkins, M.; Secco, R.; Cavalcanti, T.B.; Souza, V.C.** 2010. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/> (acessado em 27.07.2010).
- Fundação Biodiversitas, 2007.** Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/grupo3fim.asp>. (acesso em 22.06.2010).
- Garnetti, T., Conn, V. & Kaiser, B.** 2009. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant, Cell and Environment* 32: 1272–1283.
- Gerardeaux, E., Jordan-Meille, L., Constantin, J., Pellerin, S. & Dingkuhn, M.** 2010. Changes in plant morphology and dry matter partitioning caused by potassium

- deficiency in *Gossypium hirsutum* (L.). *Environmental and Experimental Botany* 67: 451–459.
- Graeff, O.R. & Pagani, Y.V.** 1996. A associação fogo-capim gordura e o desaparecimento de *Alcantarea imperialis*. *Bromelia* 3: 13-15.
- Grant, C.A., Flaten, D.N., Tomasiewicz, D.J. & Sheppard, S.C.** 2001. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Potafos – Informações agrônômicas*. 95:1-5
- Gribble, K., Conroy, J.P., Holford, P. & Milham, P.J.** 2002. In vitro uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts and relevance to media mineral formulation. *Australian Journal of Botany* 50: 713-723
- Grossi, F.** 2000. Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Gunes, A. & Inal, A.** 2009. Phosphorus efficiency in sunflower cultivars and its relationships with phosphorus, calcium, iron, zinc and manganese nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 32: 1201–1218.
- Halloran, S.M. & Adelberg, J.** 2011. A macronutrient optimization platform for micropropagation and acclimatization: using turmeric (*Curcuma longa* L.) as a model plant. *In Vitro Cell.Dev.Biol- Plant* 47:257–273
- Hikosaka, K. & Osone, Y.** 2009. A paradox of leaf-trait convergence: why is leaf nitrogen concentration higher in species with higher photosynthetic capacity? *Journal of Plant Research* 122:245–251.
- Hopkins, W.G. & Hüner, N.P.A.** 2008. Introduction to Plant Physiology. The University of Western Ontario
- Inselsbacher, E., Cambuí, C.A., Richter, A., Strange, C.F., Mercier, H. & Wanek, W.** 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist* 175:311-320.
- Jackson, W.A. & Volk, R.J.** 1995. Attributes of the nitrogen uptake systems of maize (*Zea mays* L.): maximal suppression by exposure to both nitrate and ammonium. *New Phytologist* 130(3): 327-335.
- Kanashiro, S, Ribeiro, R.de C.S., Gonçalves, A.N., Demétrio, V.A., Jocys, T. & Tavares, A.R.** 2009. Effect of calcium on the *in vitro* growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith plantlets. *Journal of Plant Nutrition* 32: 867-877.

- Kanashiro, S.** 2005. Nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Kanashiro, S., Ribeiro, R.C.S., Gonçalves, A.N., Dias, C.T.S.D. & Jocys, T.** 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Sm. cultivadas *in vitro* Hoehnea 34:59-66.
- Kerbaudy, G.** 2008. Fisiologia vegetal, 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Leme, E.M.C. & Marigo, L.C.** 1993. Bromélias na natureza. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual.
- Leme, E.M.C.** 1994. Bromélia da capa: *Vriesea imperialis*. Bromelia 1: 9-10.
- Li, Y.S., Mao, X.T., Tian, O.Y., Li, L.H. & Zhang, W.H.** 2009. Phosphorus deficiency-induced reduction in root hydraulic conductivity in *Medicago falcata* is associated with ethylene production. Environmental and Experimental Botany 67: 172–177.
- Lichtenthaler, H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L., Douce, R. (Eds). Methods in enzymology. London: Academic Press. p. 350-382.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M.** 1999. Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Luther, H.E.** 2008. An alphabetical list of Bromeliad binomials. 11 th ed. Bromeliad Society Internacional, Sarasota.
- Machado, B.M., Almeida, M.C., Nievola, C.C., Kanashiro, S. & Tamaki, V.** 2005. Obtenção de plântulas de bromélias a partir de sementes armazenadas a 10°C. In: 56º Congresso Nacional de Botânica, Curitiba. Anais. Curitiba: Sociedade Brasileira de Botânica.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A.** 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações. 2ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 319 p.
- Marschner, H.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press.
- 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. Rodriguesia 64/66: 3-10.
- 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.

- Maun, M.A.** 1994. Adaptations enhancing survival and establishment of seedlings on coastal dune systems. *Vegetation* 111: 59-70.
- Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1 (1): 57-62.
- Mercier, H.** 2004. Estudos em Bromeliaceae: desenvolvimento e metabolismo do nitrogênio. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Miranda, R.S., Sudério, F.B., Sousa, A.F. & Filho, E.G.** 2010. Deficiência nutricional em plântulas de feijão-de-corda decorrente da omissão de macro e micronutrientes *Revista Ciência Agronômica* 41(3): 326-333.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Naves, V. C.** 2001. Propagação *in vitro* da bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Nunes, J.V.C.** 2006. Bromélias. In: SIMÕES, L.L., LINO, C.F. Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. 2.ed. São Paulo: Senac. 119-132.
- Ohkama-Ohtsu, N. & Wasaki, J.** 2010. Recent progress in plant nutrition Research: cross-talk between nutrients, plant physiology and soil microorganisms. *Plant Cell Physiol.* 51(8): 1255-1264.
- Paula, M.B. de, Mesquita, H.A. de & Nogueira, F.D.** 1998. Nutrição de adubação do abacaxizeiro. *Informe agropecuário* 19 (195): 33-39
- Poole, R.T. & Conover, C.** 1976. Nitrogen, phosphorus and potassium fertilization of the bromeliad *Aechmea fasciata* Baker. *HortScience* 11: 585-586.
- Prado, R.** 2010. Phosphorus effects in the nutrition and growth of developing mango plants. *Journal of Plant Nutrition*, 33:2041–2049.
- Prado, R.M.** 2008. Nutrição de plantas. Ed. Unesp, São Paulo. 407p.
- Ramage, C. M. & Williams, R. R.** 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 38(2) 116-124.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E.** 2007. *Biologia vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Razzaque, A. H. M. & M. M. Hanafi.** 2000. Effect of calcium on pineapple production in tropical peat soil. *Indian Journal of Horticulture* 57:110–113.]
- Rubio, V., Bustos, R., Irigoyen, M.L., Cardona-López, X., Rojas-Triana, M., Paz-Ares, J.** 2009. Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Molecular Biology* 69:361-373.

- Russowski, D. & Nicolosso, F.T.** 2003. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. *Ciência Rural* 33 (1): 57-63.
- Saleem, M. F., Ma, B.L., Voldeng, H. & Wang, T-C.** 2010. Nitrogen nutrition on leaf chlorophyll, canopy reflectance, grain protein and grain yield of wheat varieties with contrasting grain protein concentration. *Journal of Plant Nutrition* 33:1681–1695
- 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 (3): 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 da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., Mcmichen, M., Predergast, G. & Rowntree, J.K.** 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42: 206-214.
- Sarmiento, R., Garcia, J.L., Mazuelo, S. C., Linan, J. & Trancoso, A.** 1994. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral composition of olive seedlings. *Acta Horticulturare* 356:156-161.
- Schumacher, M.V., Ceconi, D.E. & Santana, C.A.** 2004. Influência de diferentes doses de fósforo no crescimento de mudas de Angico-Vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan). *Revista Árvore*, Viçosa, vol. 28, n.1, p.149-155.
- Shu, M. & Xie, D.** 2010. Features of anthocyanin biosynthesis in pap1-D and wild-type *Arabidopsis thaliana* plants grown in different light intensity and culture media conditions. *Planta* 231:1385–1400
- Silva, L., Marchiori, P.E.R., Maciel, C. P., Machado, E.C. & Ribeiro, R.V.** 2010. Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. *Pesq. agropec. bras.* 45 (9): 965-972
- Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. 14: 661-1492.
- Spironello, A., Quaggio, J.A., Teixeira, L.A.J., Furlani, R. & Sigrist, J.M.M.** 2004. Pineapple yield and fruit quality effected by NPK fertilization in a tropical soil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 26: 155-159
- Taiz, L. & E. Zeiger.** 2010. *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer.

- Tamaki, V. & Mercier, H.** 2007. Cytokinins and auxin communicate nitrogen availability as long-distance signal molecules in pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Plant Physiology* 164: 1543—1547
- Tamaki, V., Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34 (1):67-73.
- Tardivo, R.C. & Cervi, A.C.O.** 1997. Gênero *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) no estado do Paraná. *Acta Botanica Brasilica* 11: 237-258.
- Terao, D., Carvalho, A.C.P.P. & Barosso, T.C.S.F.(Eds).** 2005. Flores Tropicais. Brasília, DF: Emprapa Informação Tecnológica. p. 60-83.
- 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.
- Versieux, L.M.** 2009. Sistemática, filogenia e morfologia de *Alcantarea* (Bromeliaceae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 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.
- White, P.J. & Brown, P.H.** 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* 105:1073–1080.
- Winkler, U. & Zotz, G.** 2009. Highly efficient uptake of phosphorus in epiphytic bromeliads. *Annals of Botany* 103: 477-484.
- Zhang, Z., Song, H., Liu, Q., Rong, X., Guan, C., Peng, J., Xie, G. & Zhang, Y.** 2010. Studies on differences of nitrogen efficiency and root characteristics of oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars in relation to nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition* 33:1148-1459
- Zotz, G. & Richter, A.** 2006. Changes in the carbohydrate and nutrient contents throughout a reproductive cycle indicate that phosphorus is a limiting nutrient in the epiphytic bromeliad, *Werauhia sanguinolenta*. *Annals of Botany* 97: 45-754.