

SABRINA VANESSA DE ANDRADE

**Crescimento *in vitro* da bromélia ameaçada
de extinção *Nidularium minutum* Mez em
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

2013

SABRINA VANESSA DE ANDRADE

**Crescimento *in vitro* da bromélia ameaçada
de extinção *Nidularium minutum* Mez em
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. VIVÍAN TAMAKI

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

Andrade, Sabrina Vanessa de

A553c Crescimento *in vitro* da bromélia ameaçada de extinção *Nidularium minutum*
Mez em diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio /
Sabrina Vanessa de Andrade -- São Paulo, 2013.

90 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do
Meio Ambiente, 2013

Bibliografia.

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

CDU: 582.564

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

Chico Xavier

Dedico,

A minha filha Lívia,
que tão pequena já compreende
a importância do estudo.

Ao Fábio por seu amor,
confiança e por sempre me incentivar.

E aos meus pais Jô e Fabio
pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Vívian Tamaki, por me aceitar como estagiária e posteriormente aluna de mestrado. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, dedicação, confiança e, principalmente, por acreditar no meu trabalho, quando eu mesma não acreditei. Uma pessoa maravilhosa e excelente profissional que felizmente tive a oportunidade de conhecer. Sou muito grata por tudo que fez por mim.

Ao Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, por disponibilizar as dependências para o desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Capes) pela bolsa de mestrado concedida, fundamental para a execução deste projeto.

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais Vanessa Rebouças, Francismar F. Alves, Armando Tavares, Domingos S. Rodrigues e Clóvis J. F. de Oliveira Jr. Em especial a Dra. Catarina C. Nievola e ao Dr. Shoey Kanashiro, que sempre estiveram dispostos a ajudar, com dicas e sugestões que contribuíram de forma significativa para execução do meu trabalho.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Cleonice Righetti de Campos, Ivomar Aparecido Medina e Jorge Luiz Marx Young e ao Sr. Geraldo, sempre disposto a nos ajudar nos trabalhos realizados no campo experimental.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, Victória, Nara, Priscila, Cléber, Cristiano, Carol, Naomi, Cris, Paola, Patrícia, David, Denise e Bia, em especial a Daniela, Camila, Flávia e Luciana, agradeço a todos pelos momentos agradáveis que passamos juntos e nunca serão esquecidos.

À Flavia M. Kazue Kurita que me ajudou desde o meu primeiro dia de trabalho, além de me ensinar as técnicas de laboratório, colaborou em muitos momentos difíceis me ajudando no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dr. Luciano Freschi, Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho e Dr. Shoey Kanashiro.

Aos docentes das disciplinas ministradas no programa de pós-graduação e aos funcionários da biblioteca do Instituto de Botânica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A espécie <i>Nidularium minutum</i> Mez	02
1.2. Cultivo <i>in vitro</i>	05
1.3. Macronutrientes (N, P, K e Ca).....	07
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Material vegetal.....	12
3.2. Obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	12
3.3. Crescimento das plantas em diferentes concentrações de nitrogênio (N).....	13
3.4. Crescimento das plantas em diferentes concentrações de fósforo (P).....	14
3.5. Crescimento das plantas em diferentes concentrações de potássio (K).....	15
3.6. Crescimento das plantas em diferentes concentrações de cálcio (Ca).....	15
3.7. Crescimento das plantas nas melhores concentrações anteriores.....	16
3.8. Parâmetros avaliados do crescimento.....	18
3.8.1. Análise biométrica.....	18
3.8.2. Determinação de massa.....	18
3.8.3. Pigmentos fotossintéticos.....	18
3.8.4. Análise de pH.....	19
3.9. Análises complementares.....	19
3.10. Delineamento estatístico.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1. Macronutrientes em plantas <i>in situ</i> e análise de solo.....	20
4.2. Valores de pH no meio de cultura.....	24
4.3. Plântulas com 30 dias de cultivo.....	25
4.4. Plantas com 180 dias de cultivo.....	27
4.4.1. Crescimento em diferentes concentrações de nitrogênio (N).....	27
4.4.2. Crescimento em diferentes concentrações de fósforo (P).....	37
4.4.3. Crescimento em diferentes concentrações de potássio (K).....	45
4.4.4. Crescimento em diferentes concentrações de cálcio (Ca).....	52
4.5. Resumo dos principais resultados.....	59
5. Cultivo em meio formulado a partir dos melhores resultados anteriores.....	65
6. Considerações finais.....	73

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82

1. INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae apresenta 58 gêneros e 3248 espécies (Luther, 2010), distribuídas em três subfamílias, Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Benzing, 2000). Recentemente foi proposta uma nova classificação para esta família, baseada em caracteres moleculares. De acordo com Givinish *et al.* (2011) a família Bromeliaceae possui oito subfamílias, Pitcairnioideae, Bromelioideae, Tillandsioideae, Puyoideae, Navioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae e Brocchinioideae. Com esse estudo, constatou-se que a subfamília Pitcairnioideae era formada por um grupo parafilético, portanto, necessitava de divisões para formar grupos monofiléticos.

As subfamílias tradicionais são definidas pela presença de sementes aladas, sementes plumosas e frutos carnosos (Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, respectivamente). Nesta nova classificação as subfamílias são facilmente reconhecidas pela morfologia das espécies (Givinish *et al.*, 2011).

Esta família possui ocorrência neotropical e suas espécies são típicas das Américas, exceto a *Pitcairnia feliciana*, nativa do continente africano (Leme & Marigo, 1993). Segundo Leme (1997), cerca de 40% das espécies são nativas do Brasil.

As bromélias são plantas herbáceas, perenes que possuem uma grande variedade de formas, cores e tamanhos. Podem ser encontradas em vários biomas, desde florestas úmidas como a Mata Atlântica a ambientes xéricos como a Caatinga, estendendo-se do nível do mar a grandes altitudes (Nunes, 2006).

Em relação ao hábito, as espécies podem ser epífitas, terrícolas, rupícolas ou saxícolas, sendo que a grande maioria é epífita, apresentando mecanismos adaptativos como redução do tamanho e função das raízes. De acordo com Leme & Marigo (1993), nenhuma espécie é parasita.

Os membros das subfamílias Pitcairnioideae e Bromelioideae possuem hábito terrícola, rupícola ou saxícola, apresentam raízes extensas com função de absorção (água e nutrientes), caule reduzido e muitas folhas, as quais podem formar o tanque, denominado assim, devido à capacidade de acumular água entre suas folhas. As espécies da subfamília Tillandsioideae possuem hábito epífita, com sistemas radicular e caulinar reduzidos, suas raízes têm função de aderência ao substrato ou à planta hospedeira. A absorção de nutrientes nas espécies epífitas ocorre, principalmente, via foliar através dos tricomas (Mercier, 2004).

Em termos ecológicos, as bromélias são de grande importância por acumular água e detritos em seus tanques formados pelo imbricamento de suas folhas, favorecendo o crescimento de comunidades associadas (Araújo *et al.* 2007), formando um microhabitat para

grande diversidade de insetos e pequenos animais, como sapos, salamandras, serpentes e caranguejos (Givinish *et al.* 2011). Além de servir de abrigo contra predadores para pequenos animais, contribui para a manutenção da umidade da mata com a evaporação da água contida em seus tanques.

Por ser de fácil adaptação, atualmente, as bromélias são muito utilizadas no paisagismo, devido às suas inflorescências que duram muitos meses e às suas folhas vistosas (Nunes, 2006). Segundo Duran & Monteiro (2001) o paisagismo no Estado de São Paulo contribuiu para o aumento da utilização de plantas nativas, principalmente, as bromélias. Este interesse em usá-las na decoração de ambientes e projetos paisagísticos, eleva o risco de extinção, uma vez que os produtores não conseguem atender a demanda.

O alto valor comercial, a abundância em ambiente natural e a facilidade de obtenção favorecem o extrativismo ilegal (Negrelle *et al.* 2011). Para Pereira *et al.* (2010), poucas espécies de bromélias são produzidas em escala comercial, devido à disponibilidade e fácil retirada do habitat natural.

1.1. A espécie *Nidularium minutum* Mez

A espécie *Nidularium minutum* Mez (Figura 1) pertence à subfamília Bromelioideae. Segundo Moreira *et al.* (2006) esta subfamília é composta por cerca de 30 gêneros e 425 espécies.

O gênero *Nidularium* foi descrito em 1854 por Charles-Antoine Lemaire após ter coletado na cidade de Petrópolis no Rio de Janeiro, a *Nidularium fulgens*, considerada a espécie-tipo do gênero. De acordo com Leme (2000) é um gênero endêmico da Mata Atlântica, e possui cerca de 45 espécies, podendo ser considerado o gênero da família Bromeliaceae com maior número de espécies neste bioma.

A espécie *N. minutum* é endêmica da região da Serra de Paranapiacaba, localizada em área de Mata Atlântica no estado de São Paulo (Leme, 2000), podendo ser encontrada na Estação Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, unidade de conservação do Instituto de Botânica de São Paulo.

É uma espécie terrícola, sua propagação ocorre, principalmente, por estolhos, apresenta folhas suberetas com textura fina, lâminas sublineares mais estreitas em direção a base com margens espinulosas, seus espinhos possuem aproximadamente 0,5 mm de comprimento. As brácteas primárias apresentam cor verde da parte basal até a metade e vermelha da metade a parte apical; as flores atingem de 40-45 mm de comprimento com pedicelos de 1-2 mm de comprimento. O ovário é elipsóide, cujas medidas são de 8-10 mm de

comprimento por 5 mm de diâmetro. Os frutos são brancos e o cálice persistente é verde (Moreira *et al.* 2005).

Leme (2000) criou uma chave que facilita a classificação das espécies e variedades de *Nidularium*. No caso da *N. minutum* é possível diferenciá-la pelo escapo floral que excede as bainhas foliares cerca de 1,5 a 2,5 vezes o seu comprimento; a inflorescência é bipinada, em forma de estrela no ápice e as pétalas possuem o ápice completamente branco.

Em relação aos aspectos fenológicos, o início da floração ocorre no mês de novembro estendendo-se até dezembro e a frutificação de janeiro a junho.

Essa planta está entre as espécies de bromélias ameaçadas (Wanderley e Tavares, 2011). De acordo com o *Livro Vermelho de Espécies Ameaçadas de Extinção*, a espécie encontra-se classificada como vulnerável a extinção (Mamede *et al.*, 2007).

Por ser uma espécie em risco de extinção e endêmica de um bioma considerado ameaçado devido à ação antrópica, tornam-se importantes as pesquisas que visem sua conservação e preservação. Assim, o uso de métodos que facilitam os estudos nutricionais e de multiplicação são relevantes, tal como o uso do cultivo *in vitro*. O desenvolvimento de protocolos específicos para o cultivo *in vitro* é necessário para o sucesso inicial da propagação de espécies ameaçadas (Bunn *et al.*, 2011), sendo importante na conservação de espécies nativas brasileiras (Pilatti *et al.*, 2011).



Figura 1.

(A) Espécie *Nidularium minutum* Mez, período de inflorescência em condições naturais.

(B) Detalhe da inflorescência e presença de espinhos na parte marginal das brácteas.

(C) População de *N. minutum* do Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica.

(D) Aspecto geral da espécie.

1.2. Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta bastante importante para conservação, oferecendo algumas vantagens, como grande número de plantas em curto período de tempo, ao contrário dos métodos de propagação naturais que fornecem pequeno número de plantas em longo espaço de tempo, além de gerar plantas livres de vírus e bactérias, que eventualmente infestam a planta mãe (Mercier & Nievola, 2003). De acordo com os mesmos autores, se o objetivo for preservar o patrimônio genético da espécie, a propagação deve ser iniciada a partir de sementes, as quais devem ser coletadas de exemplares de diferentes localidades, sendo considerada uma alternativa aos bancos de sementes.

De acordo com Tamaki *et al.* (2011), a técnica de cultivo *in vitro* tem sido considerada uma importante estratégia de preservação para as bromélias ornamentais.

Um aspecto importante do cultivo *in vitro* é o suprimento mineral do meio de cultura, uma vez que a nutrição mineral é essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Bunn *et al.*, 2011). Os meios de cultura utilizados, na maioria das vezes, são baseados em formulações básicas modificadas (Kanashiro, 2005), contendo compostos orgânicos, inorgânicos, inertes e substâncias naturais (Cid, 2010). Para Naves (2001), a importância na escolha de um meio de cultura ideal e uma concentração adequada é fundamental, pois é o meio que supre as necessidades nutricionais para o crescimento da planta *in vitro*.

Existem vários tipos de meios nutritivos, no entanto, um dos mais utilizados na propagação *in vitro* é o de Murashige & Skoog (MS) (1962), por conter concentrações balanceadas de nutrientes, que normalmente são favoráveis ao crescimento das espécies, além de possibilitar a alteração dos sais para novas formulações de forma mais simplificada. Em sua formulação estão presentes macro e micronutrientes (Tabela 1), vitaminas e uma fonte de carboidrato na forma de sacarose (30 g.L⁻¹).

Tabela 1. Concentrações de macro e micronutrientes (g.L^{-1}) contidas na formulação do meio de Murashige & Skoog (MS) (1962).

SAIS	QUANTIDADE (g.L^{-1})
Macronutrientes	
KNO_3	1,90
NH_4NO_3	1,65
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,44
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,37
KH_2PO_4	0,17
Micronutrientes	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0223
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0086
H_3BO_3	0,0062
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,00025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,000025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,000025

A utilização de uma fonte de carbono no cultivo *in vitro* é essencial para o crescimento das plantas. Essa necessidade ocorre porque nesta condição a fotossíntese é limitada. A sacarose é um dos carboidratos mais utilizado nos meios nutritivos, normalmente a concentração usual varia de 2% a 3% (Cid, 2010). Para Caldas *et al.* (1990) cerca de 75 a 85% do aumento da biomassa nas plantas se deve à incorporação de carbono pela adição de sacarose.

Costa *et al.* (2012) ao cultivarem *in vitro* as bromélias *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker e a *Aechmea miniata* (Beer) hort. ex Baker sob as fontes de carbono sacarose e manitol nas concentrações 87,64 mM, 43,82 e 21,85 mM, constataram que o crescimento foi maior nas plantas mantidas na maior concentração de sacarose. De acordo com os mesmos autores, alterações na concentração de sacarose podem alterar de forma significativa o metabolismo das plantas.

As vitaminas utilizadas nos meios de cultura, normalmente são as pertencentes ao grupo das hidrossolúveis, também conhecido como grupo B. Neste grupo estão presentes a tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido pantotênico, ácido nicotínico (niacina), ácido fólico, ácido ascórbico, biotina e cobalamina (Cid, 2010). Dessas vitaminas a que está presente no meio MS é a tiamina ($0,1 \text{ mg. L}^{-1}$).

De acordo com Aranda-Peres *et al.* (2009), o meio MS ainda é o meio mais usado no cultivo *in vitro*, compreendendo cerca de 50% a 75% dos estudos. A partir de estudos realizados, é possível perceber que a combinação de MS com alteração nas concentrações de seus nutrientes favorece o desenvolvimento de algumas espécies.

É importante lembrar que para se obter sucesso no cultivo *in vitro* deve-se levar em consideração a composição mineral do meio de cultura, pois as concentrações requeridas pelas plantas podem variar, de forma considerável, de espécie para espécie.

Embora existam muitos relatos sobre otimização de meios, os estudos mais frequentes são os que envolvem tipos de reguladores de crescimento e diferentes concentrações (Aranda-Peres *et al.*, 2009).

A dificuldade em se definir novos meios de cultura esta diretamente relacionada com a interação entre os elementos minerais (Nas & Read, 2004; Nierz & Evens, 2007). Sabe-se que alguns elementos em excesso podem comprometer a disponibilidade de outros, deixando-os indisponíveis para a planta. Um exemplo é o comprometimento da absorção de potássio com o aumento na concentração de íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Prado, 2008).

Uma estratégia para facilitar a formulação de meio de cultura adequado à espécie é pela análise de nutrientes em exemplares saudáveis. De acordo com Ashrafi *et al.* (2010), a otimização do meio de cultura com base na análise de nutrientes endógenos de várias partes do vegetal tem sido descritos.

A ausência de nutrientes nos vegetais podem ocasionar alterações bioquímicas, morfológicas e/ ou fisiológicas (Ashrafi *et al.*, 2010). O tipo de alteração vai depender do nutriente, nível de deficiência e tempo de exposição. Por isso, a escolha da concentração adequada é de extrema importância.

1.3. Macronutrientes (N, P, K e Ca)

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

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes mais importantes para o vegetal, segundo Taiz & Zeiger (2013) é mineral que as plantas exigem em maior quantidade. De acordo com Raven *et al.* (2007), é o principal componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas e coenzimas. No solo a forma nitrogenada disponível para as plantas pode ser nítrica (N-NO_3^-) ou amoniacal (N-NH_4^+), sendo a forma nítrica a mais abundante, em decorrência do processo

de nitrificação por bactérias que provocam a oxidação do amônio livre (Shan *et al.*, 2012). O NH_4^+ e NO_3^- são absorvidos pelas raízes das plantas por fluxo de massa e transportados pelo xilema até a parte aérea. O N_2 também pode ser absorvido pelas plantas que estabelecem associações simbióticas com bactérias fixadoras de N (Larcher, 2004). Algumas espécies de bromélias utilizam a ureia como fonte preferencial de nitrogênio, proveniente das excretas de anfíbios que utilizam seus tanques como abrigo (Cambuí, 2009).

Quando em deficiência, o nitrogênio é translocado das folhas mais velhas, que apresentam clorose, para as folhas jovens que apresentam um menor desenvolvimento. Segundo Epstein & Bloom (2006) a deficiência do N geralmente resulta em sintomas como estiolamento e clorose generalizada. Esta clorose pode estar relacionada com uma diminuição do conteúdo de pigmentos fotossintéticos, como clorofila a e b, e segundo Tamaki *et al.* (2007), o conteúdo de pigmentos fotossintéticos está relacionado com a disponibilidade de nitrogênio para o vegetal.

Plantas deficientes em N também podem acumular antocianinas (pigmentos azuis, vermelhos e púrpuros). Metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos flavonóides são responsáveis pela coloração de estruturas vegetais, que nesta situação atuam no vegetal com ação fotoprotetora e antioxidante (Taiz & Zeiger, 2013).

Outro nutriente de grande importância para o desenvolvimento das plantas é o fósforo (P), pois além de atuar no metabolismo transferindo energia das células na respiração e na fotossíntese, é um componente estrutural dos ácidos nucleicos, assim como de muitas coenzimas, fosfoproteínas e fosfolipídeos (Raven *et al.*, 2007). O P está disponível no solo na forma de fosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), sendo predominante o H_2PO_4^- . A absorção deste mineral pelas raízes das plantas ocorre por difusão e são transportados pelo xilema até a parte aérea (Prado, 2008).

Sua deficiência nos estádios iniciais de desenvolvimento pode reduzir tanto a respiração como a fotossíntese, causando sérios danos, como a diminuição da parte aérea, atraso na emergência das folhas, redução na brotação e no desenvolvimento de raízes secundárias, e menor produção de matéria seca e sementes (Grant *et al.* 2001). Segundo Epstein & Bloom (2006) os primeiros sinais de deficiência deste elemento são plantas com coloração verde-escura ou azul esverdeada. Segundo Winkler & Zotz (2009) são poucos os estudos fisiológicos envolvendo este nutriente.

Alguns trabalhos relatam que o P é absorvido rapidamente pelo vegetal, como descrito por Diniz *et al.* (1999) ao estudar a absorção de macronutrientes por explantes de bananeira cv. prata anã *in vitro*, eles constataram que o fósforo foi o nutriente absorvido mais rapidamente, cerca de 75% da concentração foi extraída do meio nos primeiros 30 dias,

cessando sua absorção aos 50 dias, sendo que o maior acúmulo de P ocorreu nas folhas. Russowski & Nicoloso (2003), constataram a influência do nutriente no crescimento, ao estudarem o efeito de diferentes concentrações de P ($0 \leq P \leq 150\%$) do meio MS (o meio original possui 1,25 mM de P) em segmentos nodais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, o ginseng brasileiro, cujas raízes são de grande interesse comercial. Eles constataram que 15 dias após o fornecimento de P para os explantes, o número de raízes foi maior na concentração com 50% de P. A altura das brotações, porém foi maior em 60% de P, decrescendo em maiores concentrações, enquanto a massa seca aumentou em 50% de P decrescendo em maiores concentrações.

Assim como ocorre com o N, plantas com pouca disponibilidade de P podem apresentar acúmulo de antocianinas (Taiz & Zeiger, 2013).

O potássio (K) é um elemento importante para as plantas por atuar como ativador de enzimas, além de estar envolvido com a abertura e fechamento de estômatos, regulação da osmose e balanço iônico (Prado, 2008).

O K está disponível no solo na forma iônica K^+ e o contato íon-raiz ocorre normalmente por difusão ou por canais e carregadores específicos. Após absorção o K é transportado via xilema para a parte aérea (Prado, 2008). Este elemento tem alta mobilidade podendo ser redistribuído com facilidade dentro do vegetal.

Sua deficiência nos vegetais, assim com o P, é caracterizada pelo aparecimento de coloração verde-escura ou azul-esverdeada nas folhas (Epstein & Bloom, 2006; Prado, 2008), podendo apresentar 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 Taiz & Zeiger (2013), os sintomas de deficiência ocorrem nas folhas mais basais devido à redistribuição do K para as folhas mais jovens.

O K também influencia no crescimento dos vegetais, como descrito por Gribble *et al.* (2002), ao trabalharem com diferentes concentrações de K ($0 \leq K \leq 80$ mM), no cultivo *in vitro* de *Gypsophila paniculata* L., pertencente a família Caryophyllaceae. Eles constataram que as massas fresca e seca das plântulas aumentaram até a concentração de 10 mM de K, decrescendo em concentrações maiores.

O cálcio (Ca) é um nutriente que tem grande participação na morfogênese, devido às interações com substâncias reguladoras de crescimento (Araujo *et al.*, 2009). Segundo Raven *et al.* (2007), o Ca é um componente importante da parede celular, está envolvido na permeabilidade da membrana celular, além de favorecer a transpiração com perda de turgescência. Para Prado (2008) a principal função do Ca é manter a integridade estrutural das membranas de várias organelas, além de ter participação direta na osmorregulação, pois a

ação do ácido abscísico (ABA) no fechamento dos estômatos depende da concentração de Ca na epiderme foliar. Também atua como mensageiro secundário em várias respostas a estímulos internos (hormonais) e externos (ambientais). Ao receber um estímulo o Ca^{2+} presente nas organelas é liberado, fazendo com que a concentração no citosol aumente. Dessa forma, ocorre a ligação do Ca a calmodulina (proteína encontrada no citosol das células vegetais) ocasionando à ativação de enzimas que irão agir ao estímulo, assim como, a ativação do Ca-APTase responsável pelo influxo do Ca^{2+} as organelas (Malavolta, 2006; Taiz & Zeiger, 2013).

Além disso, é um elemento com pouca mobilidade dentro da planta sendo necessário o fornecimento frequente deste nutriente para o crescimento dos vegetais, o que o torna um elemento de grande importância nos estudos com cultivo *in vitro*.

A deficiência de Ca nas plantas atinge primeiramente as regiões meristemáticas e as folhas jovens (Epstein & Bloom, 2006), sendo caracterizada, principalmente, pela morte dos ápices caulinares e radiculares, o sistema radicular pode ser acastanhado, curto e muito ramificado (Taiz & Zeiger, 2013), enquanto em doses elevadas pode causar clorose calcária e plantas menores (Paula *et al.*, 1998; Raven *et al.*, 2007). Segundo Marschner (1986), o Ca auxilia na desintoxicação de altas concentrações de outros elementos minerais que possam prejudicar a planta.

Plantas de *G. paniculata* cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de cálcio (0, 5, 10, 15 e 20 mM de Ca) mostraram que a massa seca da parte aérea aumentou até 1,25 mM, entretanto a massa fresca alcançou seu maior valor em 0,64 e 1,25 mM (Gribble *et al.*, 2002).

Em trabalho semelhante, Aranda-Peres *et al.* (2009) cultivaram *in vitro* as espécies *Vriesea hieroglyphica* (Carrière) E. Morren, *Vriesea friburguensis* Mez e *Vriesea unilateralis* (Baker) Mez (bromélias epífitas) em meios com diferentes concentrações de cálcio (1,5, 3, 6 e 12 mM de Ca). Ao final do experimento, os autores constataram que as plantas que apresentaram maior crescimento e acúmulo de biomassa foram as cultivadas no meio com 12 mM de Ca (quantidade quatro vezes maior do que a presente no MS completo).

São muitos os trabalhos envolvendo o cultivo *in vitro* e nutrição mineral com diversas espécies, porém nenhum envolvendo a espécie *Nidularium minutum*. Sendo assim, o desenvolvimento deste trabalho poderá subsidiar trabalhos futuros não só sobre nutrição, como também sobre aclimatização, pois a fase da transferência das condições *in vitro* para a casa de vegetação depende, muitas vezes, das condições de desenvolvimento das plantas durante o cultivo *in vitro*.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar o crescimento de plantas de *Nidularium minutum* Mez cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e cálcio (Ca), visando otimizar a produção da espécie nesta condição, e também, a elaboração de um meio ideal para o crescimento dessas plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Nos experimentos foram utilizadas sementes de *Nidularium minutum* Mez, cujos frutos foram coletados na Estação Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (Figura 2).

Os frutos foram abertos manualmente e suas sementes foram acondicionadas em sacos de papel pardo e armazenadas em condições de refrigeração a 10 °C. Vale ressaltar que a viabilidade foi confirmada e que durante a coleta não se retirou todos os frutos existentes, apenas alguns indivíduos, aproximadamente 80 de populações distintas, visando à variabilidade genética e a preservação *in situ*.



Figura 2. Fruto de *Nidularium minutum* Mez em corte longitudinal e transversal com presença de sementes de maduras. Barra = 1 cm

Foto: Carvalho, C. & Andrade, S. 2011

Plantas adultas *in situ* e amostras de solo foram coletadas para a realização de análises laboratoriais, visando identificar os nutrientes disponíveis à espécie em seu habitat natural.

3.2. Obtenção de plântulas *in vitro*

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Para a obtenção de plântulas, sementes de *N. minutum* foram submetidas à desinfestação superficial em frasco de 250 mL contendo álcool etílico a 70% por 5 minutos, sendo, em seguida, imersas em solução do fungicida Benomyl 0,1% por 15 minutos e, posteriormente, colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20, onde permaneceram por uma hora sob agitação. A seguir, em câmara de fluxo de ar estéril, a solução de hipoclorito foi retirada e o processo finalizado com quatro lavagens consecutivas das sementes com água destilada esterilizada em autoclave por 60 minutos.

Após a desinfestação, as sementes foram depositadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura composto apenas por água, sacarose (30 g.L^{-1}) e ágar (5 g.L^{-1}). Neste meio não foi adicionado nutrientes para que houvesse o consumo das reservas nutricionais presente nas sementes, antes de serem transferidas para os diferentes tratamentos.

O meio para germinação foi preparado com água destilada, o pH aferido em 5,8 com o uso de NaOH/ KCl e esterilizado por 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

As sementes permaneceram em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 30 dias. Após este período as plântulas foram transferidas para os tratamentos com diferentes concentrações de macronutrientes (descritas a seguir).

3.3. 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 composições de N (0mM; 3,75mM; 7,50 mM; 15,00 mM; 30,00 mM; 60,00 mM (MS original), 120,00 mM e 175,00 mM) (Tabela 2). Para cada concentração utilizou-se 20 frascos com cinco plântulas em cada, totalizando 160 frascos que foram mantidos sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com PAR de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura média 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 que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes pelas plantas e/ou pela alteração do pH do meio de cultura.

Tabela 2. Tratamentos com diferentes concentrações de nitrogênio (0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 90,00, 120,00 e 175,00 mM) do meio MS modificado. *Corresponde a concentração presente no meio MS original (Murashige & Skoog, 1962).

SAIS (g.L^{-1})	TRATAMENTOS (mM de N)							
	0	3,75	7,50	15,00	30,00	60,00*	120,00	175,00
KNO₃	-	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
NH₄NO₃	-	-	0,15	0,45	1,05	2,25	4,65	6,85
CaCl₂. 2H₂O	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
KH₂PO₄	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
KCl	0,70	-	-	-	-	-	-	-
K₂SO₄	0,82	-	-	-	-	-	-	-

Vale ressaltar que os demais componentes do meio MS completo foram mantidos: micronutrientes ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 22,3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; H_3BO_3 – 6,2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; KI – 0,83 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), solução F ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e Na_2EDTA – 37,2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), mioinositol – 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, tiamina – 0,1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e sacarose – 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

3.4. 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 P (0 mM; 0,30 mM; 0,60 mM; 1,25 mM (MS original); 2,50 mM; 5,00 mM e 10,00 mM) (Tabela 3). Para cada concentração utilizou-se 20 frascos com cinco plântulas em cada, totalizando 140 frascos que foram mantidos sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com PAR de 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e temperatura média 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 que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes pelas plantas e/ou pela alteração do pH do meio de cultura.

Tabela 3. Tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM) do meio MS modificado. *Corresponde a concentração presente no meio MS original (Murashige & Skoog, 1962).

SAIS ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	TRATAMENTOS (mM de P)						
	0	0,30	0,60	1,25*	2,50	5,00	10,00
KNO_3	2,02	1,99	1,96	1,90	1,77	1,52	1,01
NH_4NO_3	1,60	1,61	1,62	1,65	1,70	1,80	2,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
KH_2PO_4	-	0,04	0,08	0,17	0,34	0,68	1,36

Vale ressaltar que os demais componentes do meio MS completo foram mantidos: micronutrientes ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 22,3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; H_3BO_3 – 6,2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; KI – 0,83 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), solução F ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e Na_2EDTA – 37,2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), mioinositol – 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, tiamina – 0,1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e sacarose – 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

3.5. 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 K (0 mM; 1,88 mM; 2,50 mM; 5,00 mM; 10,00 mM; 20,00 mM (MS original) e 40,00 mM) (Tabela 4). Para cada concentração utilizou-se 20 frascos com cinco plântulas em cada, totalizando 140 frascos que foram mantidos sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com PAR de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura média 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 que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes pelas plantas e/ou pela alteração do pH do meio de cultura.

Tabela 4. Tratamentos com diferentes concentrações de potássio (0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM) do meio MS modificado. *Corresponde a concentração presente no meio MS original (Murashige & Skoog, 1962).

SAIS (g.L ⁻¹)	TRATAMENTOS (mM de K)						
	0	1,88	2,50	5,00	10,00	20,00*	40,00
KNO₃	-	0,06	0,13	0,38	0,89	1,90	3,93
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	-	-	-	-	-	-

Vale ressaltar que os demais componentes do meio MS completo foram mantidos: micronutrientes (MnSO₄.4H₂O – 22,3 mg.L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O – 8,6 mg.L⁻¹; H₃BO₃ – 6,2 mg.L⁻¹; KI – 0,83 mg.L⁻¹; Na₂MoO₄.2H₂O – 0,25 mg.L⁻¹; CuSO₄.5H₂O – 0,025 mg.L⁻¹; CoCl₂.6H₂O – 0,025 mg.L⁻¹), solução F (FeSO₄.7H₂O – 27,8 mg.L⁻¹ e Na₂EDTA – 37,2 mg.L⁻¹), mioinositol – 100 mg.L⁻¹, tiamina – 0,1 mg.L⁻¹ e sacarose – 30 g.L⁻¹.

3.6. 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; 1,50 mM; 3,00 mM (MS original), 4,50 mM e 6,00 mM) (Tabela 5). Para cada concentração utilizou-se 20 frascos com cinco plântulas em cada, totalizando 140 frascos que foram mantidos sob condições assépticas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas com PAR de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

$2.s^{-1}$ e temperatura média 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 que não ocorresse deficiência nutricional devido ao consumo dos nutrientes pelas plantas e/ou pela alteração do pH do meio de cultura.

Tabela 5. Tratamentos com diferentes concentrações de cálcio (0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM) do meio MS modificado. *Corresponde a concentração presente no meio MS original (Murashige & Skoog, 1962).

SAIS (g.L ⁻¹)	TRATAMENTOS (mM de Ca)					
	0	0,75	1,50	3,00*	4,50	6,00
KNO ₃	1,29	1,44	1,59	1,90	1,90	1,90
NH ₄ NO ₃	1,89	1,83	1,77	1,65	1,53	1,41
CaCl ₂ . 2H ₂ O	-	0,11	0,22	0,44	0,44	0,44
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
KH ₂ PO ₄	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	-	-	-	-	0,35	0,71
KCl	0,45	0,34	0,22	-	-	-

Vale ressaltar que os demais componentes do meio MS completo foram mantidos: micronutrientes (MnSO₄.4H₂O – 22,3 mg.L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O – 8,6 mg.L⁻¹; H₃BO₃ – 6,2 mg.L⁻¹; KI – 0,83 mg.L⁻¹; Na₂MoO₄.2H₂O – 0,25 mg.L⁻¹; CuSO₄.5H₂O – 0,025 mg.L⁻¹; CoCl₂.6H₂O – 0,025 mg.L⁻¹), solução F (FeSO₄.7H₂O – 27,8 mg.L⁻¹ e Na₂EDTA – 37,2 mg.L⁻¹), mioinositol – 100 mg.L⁻¹, tiamina – 0,1 mg.L⁻¹ e sacarose – 30 g.L⁻¹.

3.7. Crescimento das plantas no tratamento com as melhores concentrações dos resultados anteriores

Após a obtenção dos resultados e verificação das melhores concentrações para cada macronutriente estudado, foi preparado um meio de cultura modificado, contendo as melhores concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, visando à formulação de um meio que favorecesse o crescimento *in vitro* de *N. minutum* (Tabela 6).

Sementes foram germinadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.2 e 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. Para comparação da eficiência deste meio, foi utilizado o MS completo e algumas diluições, MS com 50% da concentração original de macronutrientes (MS/2), MS com 20% da concentração original de macronutrientes (MS/5), MS com 10% da

concentração original de macronutrientes (MS/10) e MS com 5% da concentração original de macronutrientes (MS/20) (Tabela 7).

Tabela 6. Concentrações dos macronutrientes N, P, K e Ca presentes na elaboração dos meios T1 e T2, formulados a partir dos melhores resultados anteriores.

SAIS (g. L ⁻¹)	TRATAMENTOS	
	T1	T2
KNO ₃	0,95	0,89
NH ₄ NO ₃	2,02	2,05
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,22	0,22
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37	0,37
KH ₂ PO ₄	0,08	0,17

Tabela 7. Concentração de macronutrientes no meio MS original (Murashige & Skoog, 1962) e diluições MS/2 (50% concentração de macronutrientes), MS/5 (20% concentração de macronutrientes), MS/10 (10% concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% concentração de macronutrientes).

SAIS (g. L ⁻¹)	TRATAMENTOS				
	MS	MS/2	MS/5	MS/10	MS/20
KNO ₃	1,90	0,95	0,38	0,19	0,10
NH ₄ NO ₃	1,65	0,83	0,33	0,17	0,08
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,44	0,22	0,09	0,04	0,02
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,37	0,19	0,07	0,04	0,02
KH ₂ PO ₄	0,17	0,09	0,03	0,02	0,01

Vale ressaltar que os demais componentes do meio MS completo foram mantidos: micronutrientes (MnSO₄.4H₂O – 22,3 mg.L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O – 8,6 mg.L⁻¹; H₃BO₃ – 6,2 mg.L⁻¹; KI – 0,83 mg.L⁻¹; Na₂MoO₄.2H₂O – 0,25 mg.L⁻¹; CuSO₄.5H₂O – 0,025 mg.L⁻¹; CoCl₂.6H₂O – 0,025 mg.L⁻¹), solução F (FeSO₄.7H₂O – 27,8 mg.L⁻¹ e Na₂EDTA – 37,2 mg.L⁻¹), mioinositol – 100 mg.L⁻¹, tiamina – 0,1 mg.L⁻¹ e sacarose – 30 g.L⁻¹.

Cada tratamento foi composto por 20 frascos, em cada frasco foram depositadas cinco plântulas que permaneceram nas mesmas condições de cultivo descritas para os tratamentos com as diferentes concentrações de N, P, K e Ca.

3.8. Parâmetros avaliados para avaliação do crescimento

3.8.1 Análise biométrica

O número de raízes foi avaliado pela contagem individual das plantas. Procedimento igual foi realizado para contagem das folhas, porém desconsiderando as folhas senescentes da parte basal.

O comprimento das folhas foi mensurado com régua graduada em centímetros, considerando-se a medida compreendida entre a base do caule e a extremidade da folha com maior tamanho. Enquanto para as raízes, considerou-se a medida entre a inserção no caule e o ápice da maior raiz.

3.8.2. Determinação de massa

As massas frescas e secas das partes aérea e radicular foram mensuradas em miligramas (mg) por planta. Para obtenção dos valores de massas as plantas foram separadas em folhas e raízes. Na obtenção das massas secas o material vegetal foi acondicionado individualmente em sacos de papel “Kraft” e colocado em estufa a 60°C, até obtenção de massa constante.

3.8.3. Pigmentos fotossintéticos

O processo de extração de pigmentos fotossintéticos foi baseado em Lichtenthaler (1987), onde foram utilizados acetona gelada e material vegetal em triplicatas previamente armazenadas a -20 °C. Foram macerados 0,3 g de massa fresca foliar com 3 mL de acetona gelada. A amostra foi 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 adicionada acetona pura até completar 25 mL. As amostras foram armazenadas em tubos de ensaio tampados com papel alumínio e filme de PVC transparente sob refrigeração, até o momento da leitura. As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, utilizando-se cubetas de quartzo. A absorbância (A) da clorofila a foi lida em 662 nm, clorofila b em 645 nm e dos carotenoides em 470 nm. As concentrações da clorofila a (Ca), da clorofila b (Cb) e dos carotenoides (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 carotenoides dos tecidos foram expressos em μg do pigmento por grama de massa fresca.

3.8.4. Análise de pH

O pH do meio de cultura foi aferido a cada 30 dias, utilizando-se três amostras obtidas aleatoriamente dentre os frascos que continham plantas nos diferentes tratamentos. Para análise utilizou-se papel indicador de pH (0-14) da marca Merck.

3.9. Análises complementares

Visando o melhor entendimento das exigências nutricionais de plantas da espécie *N. minutum* três amostras de solo foram coletadas da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba/ SP e encaminhadas ao Laboratório da Faculdade Cantareira para análise química do solo.

Análises de tecido vegetal e de sementes também foram realizadas para conhecimento do conteúdo endógeno de alguns indivíduos existentes em seus locais de ocorrência natural. Para a análise de nutrientes endógenos, três indivíduos adultos foram coletados da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba/ SP e para análise de nutrientes de reserva das sementes foram utilizadas 100 sementes que foram retiradas de indivíduos distintos de três populações presente na Reserva, os materiais foram encaminhados ao laboratório da Esalq/ USP.

3.10. Delineamento estatístico

As médias foram calculadas e submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Macronutrientes em plantas *in situ* e análise de solo

As análises dos tecidos foliares de exemplares saudáveis, das sementes e dos nutrientes do solo em que plantas de *N. minutum* cresciam naturalmente, contribuíram para o entendimento das necessidades nutricionais da espécie, colaborando nos estudos de propagação e cultivo das plantas.

Com os resultados obtidos na análise do conteúdo de macronutrientes das sementes (Tabela 8), constatou-se a presença de maior quantidade de N seguida de K. De modo geral, os resultados reforçaram a importância em germinar as sementes em meio de cultura sem adição de nutrientes. Os nutrientes do meio de cultura poderiam influenciar no crescimento das plantas e alterar o resultado final, se as sementes fossem germinadas em meio contendo macro e micronutrientes.

Constatou-se durante este estudo que, para o cultivo *in vitro*, as reservas nutricionais contidas nas sementes de *N. minutum* são suficientes para manter as plântulas saudáveis por até 30 dias após a germinação. Depois deste período as plantas começam apresentar alguns sintomas visuais de deficiência nutricional, como alteração na coloração e senescência foliar.

Tabela 8. Conteúdo de macronutrientes nas sementes de plantas de *Nidularium minutum* Mez obtidos de amostras retiradas de plantas existentes na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba/ SP. Análises feitas pelo Laboratório da Esalq/ USP.

Material	Macronutrientes (mg.g ⁻¹ semente)					
	N	P	K	Ca	Mg	S
Amostra 1	3,96	0,63	1,82	0,25	0,33	0,22
Amostra 2	4,96	0,61	2,03	0,23	0,37	0,21
Amostra 3	5,40	0,60	1,98	0,23	0,33	0,20
Média	4,77^a	0,61^c	1,94^b	0,24^c	0,34^c	0,21^c

N – nitrogênio; P – fósforo; K – potássio; Ca – cálcio; Mg – magnésio e S – enxofre.

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os macronutrientes de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da análise de macronutrientes foliares (Tabela 9) mostraram que as plantas mantidas em ambiente natural possuem maior disponibilidade de N e K, tal como nas sementes, com uma média de 20,56 e 17,85 g.Kg⁻¹ de matéria seca, respectivamente. De acordo com esses resultados, constatou-se que a disponibilidade de N e K foliar é igual na

espécie em estudo. Informação importante para o entendimento do comportamento desta espécie, uma vez que é sabido que para a maioria das plantas o N é requerido em maior quantidade (Taiz & Zeiger, 2013).

Tabela 9. Conteúdo de macronutrientes foliares de plantas de *Nidularium minutum* Mez obtidos em amostras de plantas adultas coletadas na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba/ SP. Análises feitas pelo Laboratório da Esalq/ USP.

Material	Macronutrientes (g. kg ⁻¹ de matéria seca)					
	N	P	K	Ca	Mg	S
Amostra 1	24,68	1,29	12,24	6,13	2,30	1,58
Amostra 2	19,20	1,42	23,21	5,52	2,17	1,66
Amostra 3	17,79	2,05	18,11	6,00	2,13	1,72
Média	20,56a	1,59b	17,85a	5,88b	2,20b	1,65b

N – nitrogênio; P – fósforo; K – potássio; Ca – cálcio; Mg – magnésio e S – enxofre.

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os macronutrientes de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As análises do conteúdo dos nutrientes presentes no solo, onde ocorrem naturalmente *N. minutum*, mostraram quais nutrientes estão disponíveis para as populações da espécie e como estão distribuídos (Tabela 10). Além dos nutrientes e sua disponibilidade, obteve-se valores de pH, capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação de bases (V%) do solo, informações importantes, pois estão diretamente relacionados com a disponibilidade de nutrientes no solo.

Em relação à disponibilidade de nutrientes, constatou-se que das 28 g/dm³ de matéria orgânica presente no solo, 1,4 g/dm³ corresponde à quantidade de N. Dos macronutrientes relacionados neste estudo o N é o que está presente em maior quantidade no solo, seguido de K com 0,023 g/dm³, Ca com 0,020 g/dm³ e P com 0,005 g/dm³.

Analisando a disponibilidade de K e Ca no solo da Reserva Biológica de Paranapiacaba nota-se pouca diferença entre os valores, no entanto, ao verificar a quantidade desses nutrientes nos tecidos foliares e sementes percebe-se uma maior concentração de K em relação ao Ca.

A pouca disponibilidade no solo, competição com outros íons e pH ácido são fatores que comprometem a absorção de um nutriente pelas plantas. Sabe-se que o íon K⁺ e Ca²⁺, assim como o Mg²⁺, competem pelo mesmo sítio de absorção, dessa forma, acredita-se que os altos teores de K nos tecidos foliares e sementes das plantas de *N. minutum* ocorreram pelo

uso eficiente do nutriente pelas plantas. De acordo com Mendes *et al.* (2012), quando um determinado nutriente está presente nos tecidos foliares em maior concentração em relação aos demais, mesmo sob condições desfavoráveis, se deve, provavelmente à maior exigência da cultura a esse nutriente.

Constatou-se, também, que o solo da região possui um pH em torno de 3,5, considerado ácido. Sabe-se que o pH do solo afeta a disponibilidade dos nutrientes minerais e de acordo com Prado (2008), os solos ácidos comprometem a absorção dos macronutrientes, favorecendo a disponibilidade dos micronutrientes às plantas.

Segundo Ronquim (2010), o pH fornece indícios das condições químicas gerais do solo. Quando o solo apresenta acidez elevada, ou seja, baixos valores de pH, geralmente apresentam: pobreza em bases principalmente cálcio e magnésio, elevado teor de alumínio tóxico, excesso de manganês, alta fixação de fósforo nos coloides do solo e deficiência de alguns micronutrientes.

A CTC e V% apresentaram um valor médio de 84 e 6 $\text{mmol}_c/\text{dm}^3$, respectivamente. A CTC é a capacidade que o solo tem de reter ou liberar nutrientes para serem absorvidos e aproveitados pelas plantas, enquanto a V% é a soma das bases trocáveis expressa em porcentagem de capacidade de troca de cátions, sendo considerado um excelente indicativo das condições gerais de fertilidade do solo (Ronquim, 2010).

Taiz & Zeiger (2013) explicam que a CTC, está relacionada com o tipo de solo e que geralmente solos com alta capacidade de troca de cátions, possuem uma maior reserva de nutrientes minerais. No entanto, o solo só é considerado favorável à nutrição das plantas se a maior parte da CTC estiver ocupada por cátions essenciais como Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ , caso a CTC esteja ocupada por cátions potencialmente tóxicos como H^+ e Al^{3+} o solo será considerado pobre (Ronquim, 2010).

Um solo pode apresentar alto valor de CTC total como ocorreu em duas amostras da análise de solo da Reserva Biológica de Paranapiacaba (101 e 111 $\text{mmol}_c/\text{dm}^3$), mas se grande parte das cargas negativas do solo estiverem absorvendo íons H^+ a troca efetiva será inferior, classificando o solo como pobre.

Os valores obtidos nas amostras para a análise de V% foram considerados como muito baixo. De acordo com Ronquim (2010) um índice V% baixo significa que há pequenas quantidades de cátions, como Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ , saturando as cargas negativas dos coloides e que a maioria delas está sendo neutralizada por H^+ e Al^{3+} , neste caso o solo, provavelmente, seja ácido, podendo até conter alumínio em nível tóxico às plantas. Segundo o autor, a maioria das culturas apresenta boa produtividade quando no solo é obtido valor de V% entre 50 e 80% e valor de pH entre 6,0 e 6,5.

De acordo com essas informações, pode-se considerar o solo da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (área onde se localizam as populações de *N. minutum*) como pobre em nutrientes.

Tabela 10. Conteúdo de nutrientes no solo da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba/ SP, região onde estão às populações de *Nidularium minutum* Mez. Análises feitas pelo Laboratório de Fertilidade do Solo da Faculdade Cantareira.

Material	M.O.	Presina	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	pH
	g/ dm ³	mg/dm ³mmol _c /dm ³							CaCl ₂
Amostra 1	26	5	98	0,5	1	1	3	101	3	3,3
Amostra 2	38	4	109	0,6	1	1	3	111	3	3,1
Amostra 3	20	7	35	0,7	1	3	5	40	12	4,3
Média	28	5	81	0,6	1	2	4	84	6	3,5
Classe	P resina				K	Ca	Mg	pH	V%	
	Florestais	Perenes	Anuais	Hortaliças	(CaCl ₂)					
Muito baixo	0 – 2	0 – 5	0 – 6	0 – 10	0,0 – 0,7					
Baixo	3- 5	6 – 12	7 – 15	10 – 25	0,8 – 1,5	0 – 3	0 – 4	4,4 – 5,0	26 – 50	
Médio	6-10	13 – 30	16 – 40	25 – 60	1,6 – 3,0	4 – 7	5 – 8	5,1 – 5,5	51 – 70	
Alto	10-20	31 – 60	41 – 80	61 – 120	3,1 – 6,0	>7	>8	5,6 – 6,0	71 – 90	
Muito alto	>20	>60	>80	>120	>6	>6			>90	

M.O. – matéria orgânica; P resina – fósforo; K – potássio; Ca – cálcio; Mg – magnésio; SB – saturação de bases; CTC – capacidade de troca catiônica; V% – porcentagem de saturação de bases
Metodologia – De acordo com o BT 81 do IAC (P, K, Ca, Mg) – Extração pela resina trocadora de íons.

As quantidades endógenas de macronutrientes presentes nos tecidos foliares de *N. minutum* corroboram com os resultados de análise do solo, visto que a presença dos macronutrientes segue a mesma tendência N>K>Ca>P. Em relação à quantidade de nutrientes nas sementes houve uma diferença nessa tendência, pois os teores médios de P eram maiores em relação ao Ca.

Os resultados descritos acima foram importantes nos estudos, com o uso do cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de macronutrientes, sobre o crescimento das plântulas de *N. minutum*. De acordo com Reed *et al.* (2011) o entendimento das exigências metabólicas e nutricionais são importantes para a conservação das espécies ameaçadas.

4.2. Valores do pH no meio de cultura

No cultivo *in vitro* ou *ex vitro* existem alguns fatores internos ou externos que podem afetar a absorção de nutrientes pelas raízes das plantas, sendo o valor do pH considerado o mais importante.

No processo de absorção pode ocorrer a competição entre o H^+ e outros cátions, e do OH^- com outros ânions, pelos mesmos sítios carregadores da membrana. Dessa forma, em solos com reação ácida [H^+] ou alcalina [OH^-] ocorre à diminuição da absorção de cátions ou de ânions, respectivamente. Para que não haja comprometimento na absorção dos nutrientes minerais pelas plantas o pH do solo deve estar entre 5,5 e 6,5, pois esta faixa é favorável à disponibilização de macro e micronutrientes (Prado, 2008).

Com a obtenção dos valores de pH durante os 180 dias de cultivo *in vitro* de plantas de *N. minutum*, constatou-se que ocorreu uma acidificação significativa do meio com o decorrer dos dias (Tabela 11). Esses resultados reforçam a importância em se realizar subcultivo das plantas mantidas *in vitro* após um determinado período. Neste estudo o subcultivo foi realizado após 90 dias, contados a partir da transferência para os diferentes tratamentos, período em que o valor do pH estava entre 3,0 – 4,0. Embora os valores adequados sejam na faixa de 5,5 a 6,5, conforme mencionado anteriormente, acredita-se que o subcultivo neste período ainda seja viável, pois as plantas não apresentavam sinais visíveis de deficiência nutricional.

De acordo com os resultados da análise química do solo da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, o solo da região é considerado ácido com pH em torno de 3,5. Esse resultado reforça a possibilidade das plantas desta espécie estarem adaptadas a pouca disponibilidade de nutrientes, principalmente dos macronutrientes e por isso não apresentaram sintomas de deficiência após 180 dias de cultivo com a acidificação do meio de cultura.

Sabe-se que o cultivo *in vitro* apesar de eficiente tem um custo maior que os meios tradicionais de cultivo, dessa forma, com um intervalo maior entre os subcultivos, têm-se uma economia sem comprometimento da produção, uma vez que para esta espécie não se constatou alterações no crescimento das plantas.

Tabela 11. Valores do pH no meio de cultura utilizado para o cultivo *in vitro* de plantas de *Nidularium minutum* Mez.

PERÍODO	VALOR pH
Início da germinação	5,8
30 dias	5,0
60 dias	4,0 – 5,0
90 dias	3,0 – 4,0
120 dias	3,0
180 dias	2,0 – 3,0

4.3. Plântulas com 30 dias de cultivo

As plântulas obtidas após 30 dias de germinação em placas de Petri (Figura 3) foram transferidas para os tratamentos contendo as diferentes concentrações de nutrientes (N, P, K e Ca) (Figura 3).

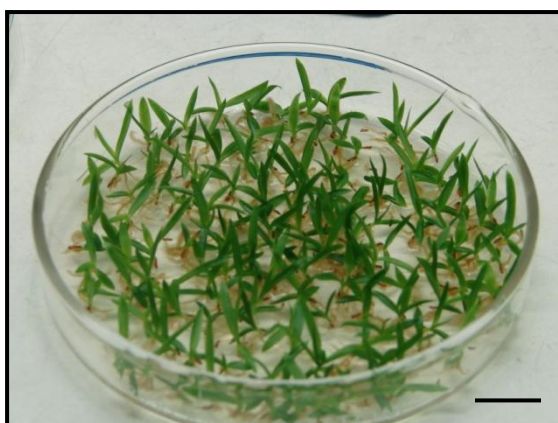


Figura 3. Plântulas de *Nidularium minutum* Mez cultivadas *in vitro* após 30 dias sem adição de nutrientes no meio. Barra = 1 cm

Antes de transferir as plântulas para os tratamentos, a fim de constatar a influência das diferentes concentrações de N, P, K e Ca no crescimento das plantas de *N. minutum*, análises de crescimento foram realizadas. Apenas a quantidade de pigmentos fotossintéticos não foi realizada devido à insuficiência de material vegetal.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* as plântulas de *N. minutum* apresentaram em média $2,0 \pm 0,6$ folhas por planta com um comprimento médio de $0,7 \pm 0,1$ cm. Em relação ao sistema radicular, as plântulas continham em média $2,0 \pm 0,7$ raízes cujo comprimento médio era de $0,5 \pm 0,2$ cm (Tabela 12).

Em relação ao acúmulo de massas, os resultados são referentes a uma amostra composta por 20 plântulas. Para a parte aérea o valor médio das massas fresca e seca foram

52±10 e 6±0 mg, respectivamente. Em relação às raízes o acúmulo de massa fresca foi de 8±0 mg e para massa seca 3±0 mg.

Tabela 12. Quantidades de folhas e raízes e comprimentos das partes aérea e radicular de plântulas de *Nidularium minutum* Mez após 30 dias de cultivo *in vitro* a partir de sementes, sem a adição de nutrientes no meio de cultura. n=60

	Número de folhas	Comprimento parte aérea (cm)	Número de raízes	Comprimento radicular (cm)
Média	2	0,7	2	0,5
Desvio Padrão	0,6	0,1	0,7	0,2

Tabela 13. Conteúdo de massas fresca e seca das partes aérea e radicular de plântulas *Nidularium minutum* Mez após 30 dias de cultivo *in vitro* a partir de sementes, sem a adição de nutrientes no meio de cultura. Amostra composta por 20 plantas.

Amostras¹	Massa fresca parte aérea (mg.20planta ⁻¹)	Massa seca parte aérea (mg.20planta ⁻¹)	Massa fresca radicular (mg.20planta ⁻¹)	Massa seca radicular (mg.20planta ⁻¹)
A 1	59	9	6	2
A 2	50	5	7	3
A 3	45	4	12	3
Média	52	6	8	3
Desvio Padrão	10	0,0	0,0	0,0

4.4. Plantas com 180 dias de cultivo nos diferentes tratamentos

4.4.1. Crescimento em diferentes concentrações de nitrogênio (N)

Com os resultados obtidos após 180 dias de cultivo *in vitro* foi possível perceber que as modificações realizadas nas concentrações de N influenciaram no crescimento das plantas da espécie em estudo (Figura 3).

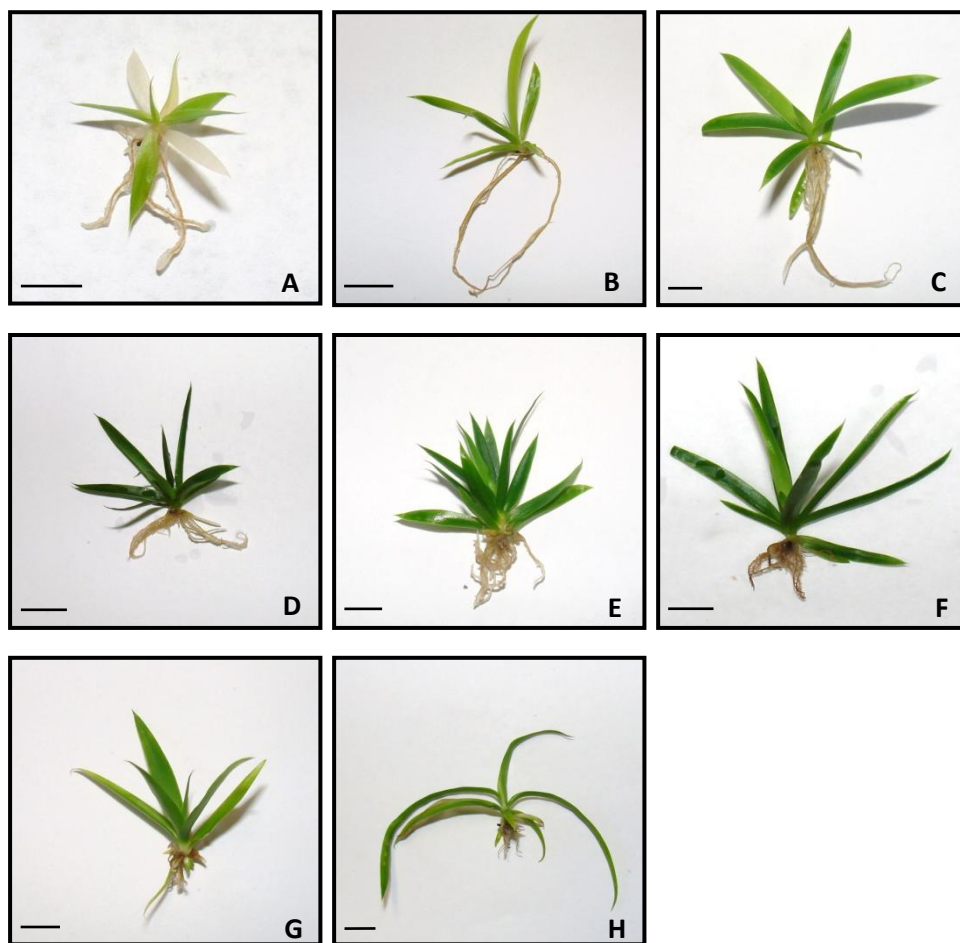


Figura 3. Aspecto das plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrogênio. (A) Plantas cultivadas na ausência de N; (B) Plantas cultivadas em 3,75 mM de N; (C) Plantas cultivadas em 7,50 mM de N; (D) Plantas cultivadas em 15,00 mM de N; (E) Plantas cultivadas em 30,00 mM de N; (F) Plantas cultivadas em 60,00 mM de N; (G) Plantas cultivadas em 120,00 mM de N e (H) Plantas cultivadas em 175,00 mM de N. Barra = 1 cm.

Dentre todas as concentrações utilizadas a que resultou em plantas com maior quantidade de folhas ($12,0\pm 0,4$) foi a que continha 30 mM de N no meio de cultura, que corresponde à metade da quantidade de N presente no meio MS completo (Figura 4). As plantas mantidas no tratamento sem a presença de N, além de apresentarem uma quantidade menor de folhas ($5,0\pm 0,5$), apresentaram uma coloração mais clara que as demais (um pouco de clorose) e senescência de algumas folhas (Figura 5). A clorose foi mais acentuada nas folhas mais velhas. Segundo Epstein & Bloom (2006), a falta de pigmento nas folhas mais velhas ocorre devido à redistribuição do N para as folhas mais novas, para que estas não tenham o crescimento comprometido. Coelho *et al.* (2011) ao caracterizarem os sintomas visuais de *Tagetes erecta* L. sob deficiências nutricionais constataram que omissão do N comprometeu o crescimento das plantas que apresentaram clorose generalizada das folhas mais basais, assim como ocorreu com a espécie *N. minutum*.

Kanashiro (2005) ao estudar o crescimento *in vitro* da bromélia *A. blanchetiana* em diferentes concentrações de N ($7,5\leq N\leq 120\text{mM}$), verificou que o incremento desse macronutriente, resultou no aumento da quantidade de folhas após 120 dias. Tendência que pode ser observada em *N. minutum* até 30 mM de N.

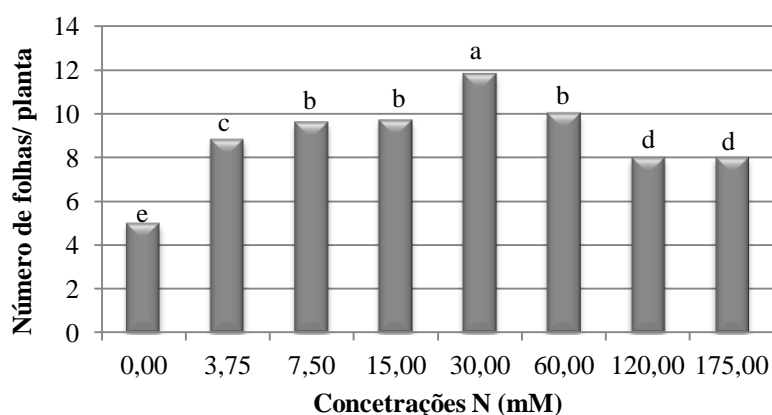


Figura 4. Número de folhas por planta de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio (N). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 5. *Nidularium minutum* Mez apresentando clorose nas folhas mais velhas após 180 dias de cultivo *in vitro* sem adição de nitrogênio no meio de cultura. Barra = 1 cm.

Em relação ao comprimento da parte aérea (Figura 6), constatou-se que o aumento na concentração de N resultou em folhas mais compridas, sendo que as maiores folhas foram observadas nas concentrações de 60 a 175 mM de N.

Resultados que diferem dos encontrados por Russowski e Nicoloso (2003) ao estudarem o efeito de diferentes concentrações de N ($0 \leq N \leq 150\%$) do meio MS em plantas provenientes de segmentos nodais de *P. glomerata*, o ginseng brasileiro. Os autores constataram que as diferentes concentrações de N influenciaram na altura das brotações até 60 mM de N, decrescendo em maiores concentrações.

Araujo (2004) verificou que o incremento nas concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 proporcionou um aumento no comprimento foliar de plântulas da orquídea *Cattleya leopoldii* Verschaff. ex Lem.. Resultado semelhante ao encontrado neste estudo para a espécie *N. minutum* que apresentou maior comprimento da parte aérea nas plantas mantidas em 175 mM de N.

De acordo com Larcher (2004), altas concentrações de N provocam um crescimento acentuado da parte aérea e um desenvolvimento inadequado dos tecidos de sustentação.

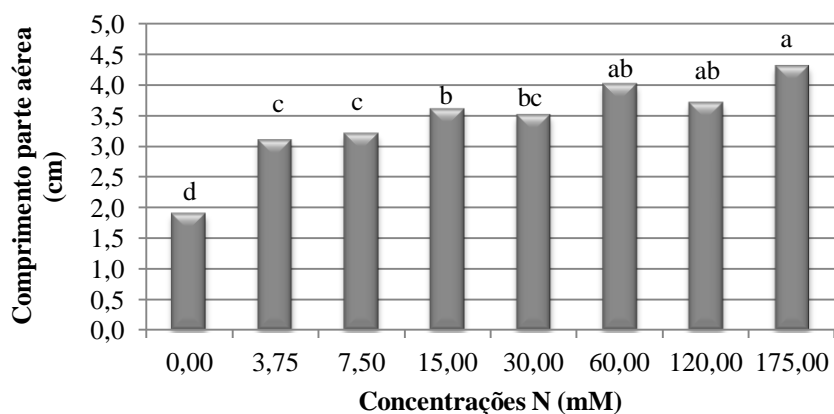


Figura 6. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0; 3,75; 7,50; 15,00; 30,00; 60,00; 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio (N). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao número de raízes (Figura 7) os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre as concentrações de 7,5 a 120 mM de N. Comportamento semelhante ao encontrado por Araujo *et al.* (2009) ao trabalharem com a *Cattleya loddigesii* Lindl. cultivadas *in vitro* nas concentrações 0, 200, 400, 600 e 800 mg L⁻¹ de NH₄NO₃.

De acordo com Epstein e Bloom (2006), o aumento na quantidade de nutrientes favorece a multiplicação das raízes. Tendência não encontrada em *N. minutum*, que apresentou resultados estatisticamente iguais para as concentrações de 7,5 a 120 mM de N.

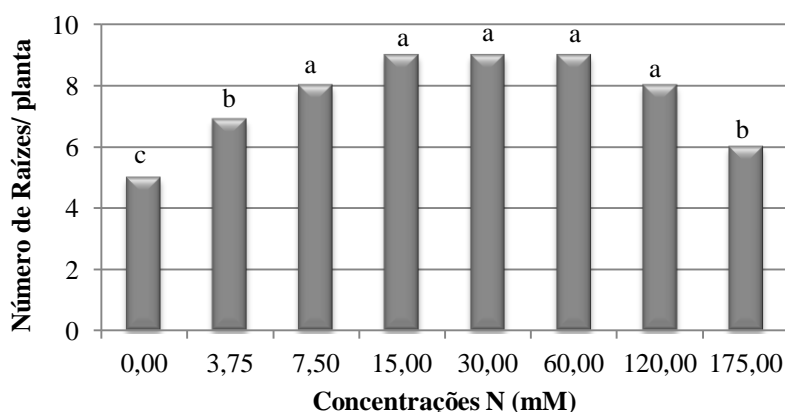


Figura 7. Número de raízes de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio (N). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao comprimento radicular, o incremento de N resultou na redução gradativa das raízes, a partir da concentração com 7,5 mM de N (Figura 8). O comportamento da espécie foi semelhante a outras bromélias cultivadas em diferentes concentrações de N.

Grossi (2000) observou, em plantas de *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (bromélia epífita) cultivadas *in vitro*, que o aumento da concentração de N ($1,78 \leq N \leq 30 \text{mM}$) diminuía o sistema radicular. Essa mesma tendência foi obtida por Kanashiro (2005) ao trabalhar com *A. blanchetiana* (bromélia epífita com tanque), onde o aumento da concentração de N ($7,5 \leq N \leq 120 \text{mM}$) também resultou em diminuição gradativa no comprimento das raízes.

O crescimento reduzido em altas concentrações de N, provavelmente ocorreu devido ao excesso de sais no meio. De acordo com Taiz & Zeiger (2013), quando o excesso de íons no solo atinge níveis que comprometam a disponibilidade hídrica ou excedam o nível adequado de um determinado nutriente o crescimento radicular é comprometido.

Segundo Van Der Werf (1996), a disponibilidade de N exerce uma forte influência na alocação de biomassa na raiz e na parte aérea, porém uma redução no fornecimento promove, inicialmente, crescimento radicular e redução no crescimento da parte aérea. Relação que pode ser vista em *N. minutum* ao comparar os resultados do comprimento da parte aérea e radicular.

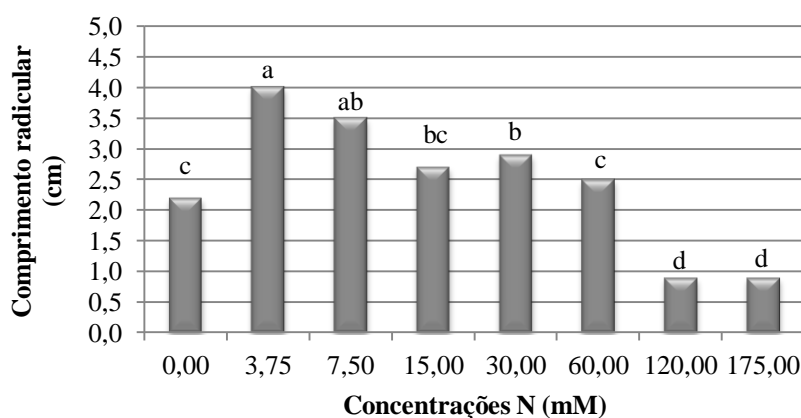


Figura 8. Comprimento radicular (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio (N). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação às massas fresca e seca da parte aérea (Figuras 9 e 10) as médias aumentaram com o aumento na concentração de N. A análise de matéria fresca (Figura 9) mostrou um maior acúmulo de massa nas plantas mantidas nas concentrações de 60 a 175 mM de N. No entanto, com a análise de massa seca (Figura 10) foi possível perceber que as plantas mantidas nas concentrações de 15 mM de N e acima tiveram um maior acúmulo de

massa seca, sendo o maior valor de média obtido nas plantas cultivadas em 120 mM de N, apresentando 15 ± 2 mg.

Kanashiro (2005) trabalhando com a bromélia *A. blanchetiana* percebeu que com o aumento da concentração de N ($7,5 \leq N \leq 120$ mM) no meio MS modificado, houve a redução gradativa da massa fresca da parte aérea. Tendência não observada em *N. minutum*, que apresentou maior quantidade de massa fresca da parte aérea nas maiores concentrações (60, 120 e 175 mM de N).

Silva *et al.* (2012) ao trabalharem com o crescimento de plantas da bromélia terrícola *Ananas ananassoides* (Baker) LB Sm. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de N ($0 \leq N \leq 175$ mM) constataram que as alterações nas concentrações do nutriente não influenciaram no acúmulo de massa seca da parte aérea. Resultado que difere dos encontrados para *N. minutum* que apresentaram as maiores médias nas concentrações contendo 60 e 120 mM de N.

Para Bellote & Silva (2000) a massa seca da parte aérea é uma característica importante na análise de uma muda. Segundo os autores as folhas constituem uma das principais fontes de fotoassimilados e nutrientes, que são vitais para adaptação da planta no pós-plantio. Assim, plantas com mais massa seca de parte aérea podem ter mais sucesso na fase de aclimatização.

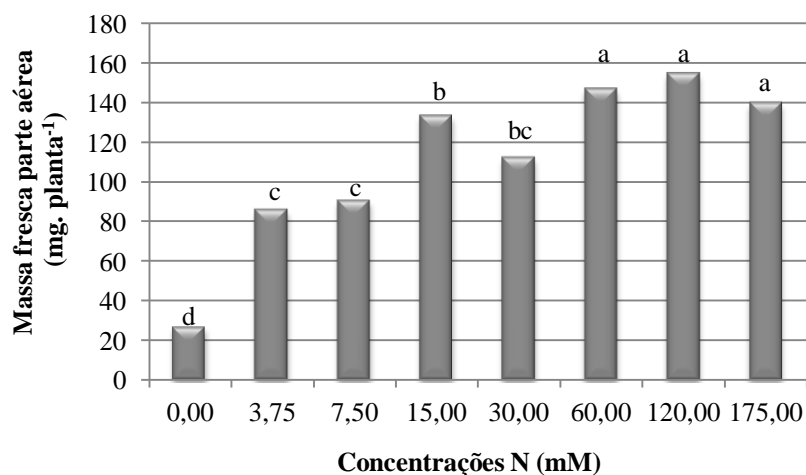


Figura 9. Massa fresca parte aérea (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio (N). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

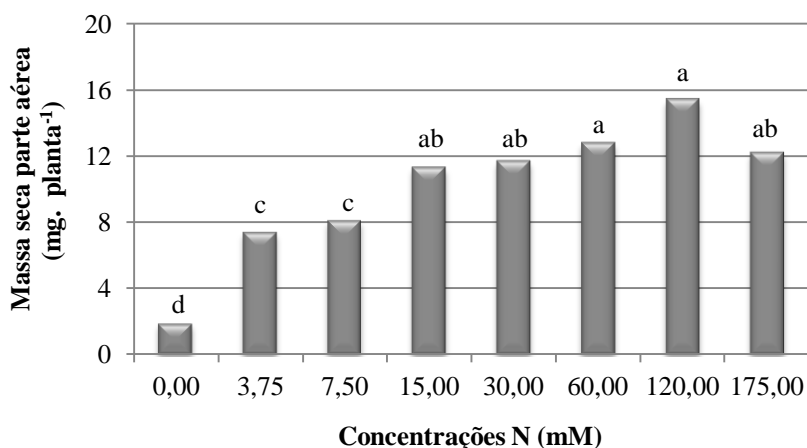


Figura 10. Massa seca parte aérea (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o parâmetro massa fresca radicular (Figura 11) as plantas mantidas na concentração com 15 mM de N apresentaram uma maior quantidade de massa (37 ± 5 mg), enquanto as demais concentrações apresentaram plantas com resultados bem inferiores (cerca de 2,3 vezes menores). Os resultados da massa seca radicular mostraram uma tendência à redução, conforme o aumento da concentração após 15 mM de N. As plantas mantidas na ausência de N apresentaram $0,8 \pm 0,0$ mg, enquanto o maior acúmulo de biomassa ocorreu nas plantas que permaneceram em 15 e 30 mM de N com $4,2 \pm 1,0$ mg e $3,9 \pm 1,0$ mg, respectivamente, decrescendo nas concentrações seguintes (Figura 12).

Kanashiro *et. al.* (2007), trabalhando com *A. blanchetiana* constataram que com o aumento da concentração de N ($7,5 \leq N \leq 120$ mM) no meio MS modificado, levou a uma diminuição gradativa da massa seca radicular. O mesmo ocorreu com *N. minutum* após 15 mM de N.

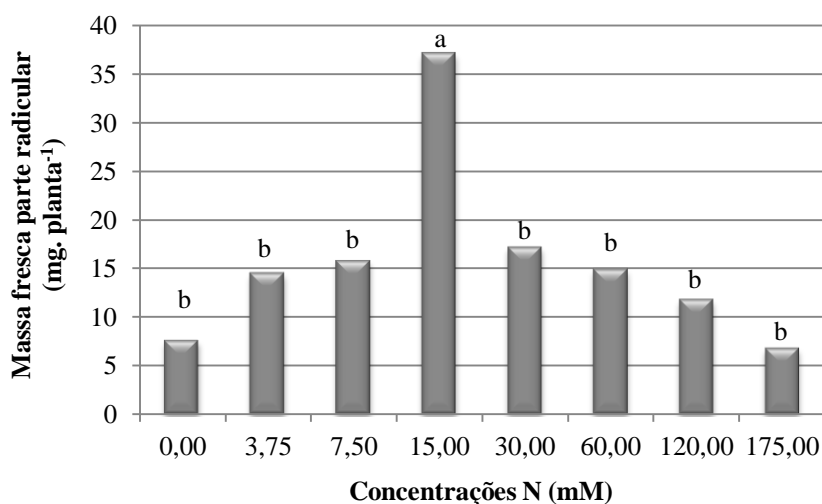


Figura 11. Massa fresca radicular (mg) de plantas da espécie *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio (N). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

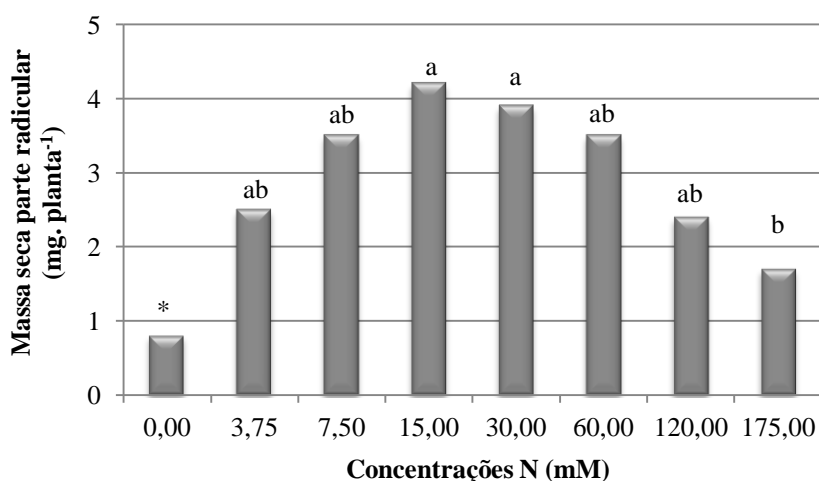


Figura 12. Massa seca radicular (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio (N). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade. Asterisco (*) indica que não foi possível realizar a análise estatística desta concentração, devido a pouca quantidade de massa obtida.

Os valores obtidos na análise de pigmentos fotossintéticos demonstraram que a variação na quantidade de N entre as concentrações 7,5 a 120 mM de N não resultaram em diferenças significativas (Figura 13). Em todas as concentrações os resultados obtidos para quantidades de clorofila a, b e carotenoides seguiram a mesma tendência (Figura 13).

Os menores teores de pigmentos foram encontrados nas concentrações sem a presença de N com 114,560 μg de clorofila a.g⁻¹MF, 38,785 μg de clorofila b.g⁻¹MF e 37,378 μg de

carotenoides.g⁻¹MF e em 3,75 mM de N com 254,079 µg de clorofila a.g⁻¹MF, 147,252 µg de clorofila b.g⁻¹MF e 72,592 µg de carotenoides.g⁻¹MF.

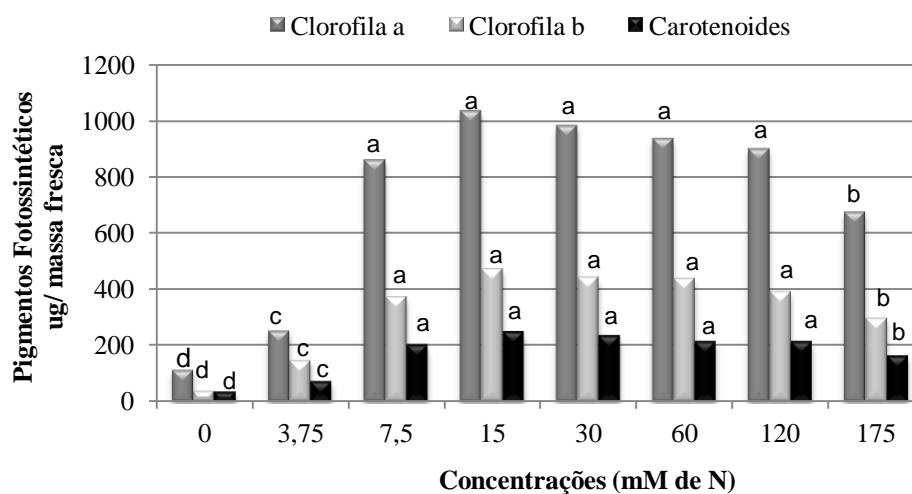


Figura 13. Pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides) (µg/ massa fresca) extraídos de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM de nitrogênio (N). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Kurita *et al.* (2012) ao estudarem a quantidade de pigmentos fotossintéticos em plantas das bromélias *Ananas ananassoides* ($0 \leq N \leq 175$ mM), *A. imperialis* ($0 \leq N \leq 120$ mM) e *N. minutum* ($0 \leq N \leq 175$ mM) cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de N, constataram que o acúmulo de pigmentos fotossintéticos em função da disponibilidade do nutriente não segue uma tendência entre as espécies. Para a espécie *N. minutum*, os autores constataram uma redução significativa na concentração dos pigmentos nas concentrações que continham uma maior quantidade de sais (120 e 175 mM de N). A mesma tendência foi observada neste estudo. As possíveis diferenças nos padrões dos resultados podem estar relacionadas a fatores como pH e estado físico do meio de cultura ou ainda o método utilizado para germinação das sementes. Os autores utilizaram para germinação das sementes o meio MS com 50% da concentração de macronutrientes, enquanto neste trabalho o meio utilizado para germinação não continha adição de nutrientes.

Segundo Prado (2008) a quantidade de clorofila pode demonstrar um estado nitrogenado da planta, visto que para sua formação são necessários quatro átomos de N, sendo que a aplicação de N incrementa linearmente o teor de clorofila nas folhas. Para Hikosaka & Osone (2009), o aumento na concentração de N fornecido as plantas pode aumentar a sua capacidade fotossintética. Essa tendência foi constatada para a espécie *N. minutum* de 0 até 7,5 mM de N, nas demais concentrações o incremento de N não alterou os teores de

pigmentos de forma significativa, entre 7,5 e 120 mM de N, sugerindo, talvez, que a quantidade de pigmentos já estava próxima à maior capacidade de síntese a partir do uso de 7,5 mM de N.

Tamaki (2003) trabalhando com *Ananas comosus* (L.) Merr. (bromélia terrícola) cultivada *in vitro* a partir de segmento nodal, observou que sem a fonte nitrogenada (0 mM de N) a quantidade de clorofilas a e b diminuíram acentuadamente após 60 dias até os 180 dias de cultivo. No presente trabalho observou-se que mesmo sem a presença da fonte nitrogenada as plantas apresentaram clorofilas até 180 dias de cultivo.

Segundo Ferreira & Borghetti (2004) a sobrevivência da planta na ausência de N (0 mM de N), pode ocorrer devido a reserva que havia na semente. Como neste estudo as reservas das sementes foram consumidas durante a germinação, sugere-se que a sobrevivência ocorreu por ser a espécie *N. minutum* adaptada a pouca disponibilidade de N, visto que cresce em solo pobre em N (ver Tabela 9).

Com a análise de todos os resultados obtidos nas diferentes concentrações de N foi possível constatar que a ausência do nutriente comprometeu o crescimento da espécie por 180 dias em cultivo *in vitro*. As plantas mantidas nesta condição tinham tamanho reduzido, poucas folhas e raízes, além de clorose.

Analisando os resultados, juntamente com o aspecto geral das plantas utilizadas neste experimento, sugere-se que a concentração contendo 60 mM de N (a mesma do presente no meio MS completo) seja a mais indicada para o cultivo *in vitro* da espécie.

4.4.2. Crescimento em diferentes concentrações de fósforo (P)

As plantas cultivadas nas diferentes concentrações de fósforo (P), assim como as mantidas nas diferentes concentrações de N, apresentaram crescimento diferenciado após 180 dias de cultivo *in vitro* (Figura 14).

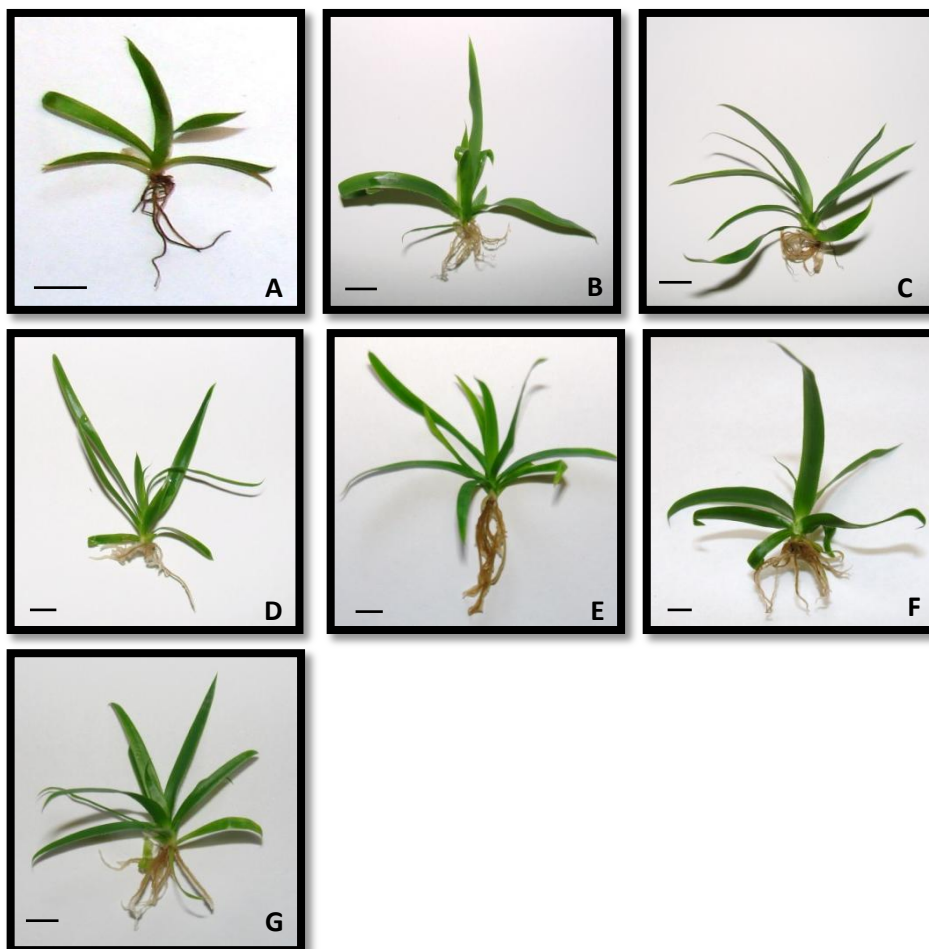


Figura 14. Aspecto das plantas *N. minutum* após 180 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de fósforo (P). (A) Plantas cultivadas em na ausência de P; (B) Plantas cultivadas em 0,30 mM de P; (C) Plantas cultivadas em 0,60 mM de P; (D) Plantas cultivadas em 1,25 mM de P; (E) Plantas cultivadas em 2,50 mM de P; (F) Plantas cultivadas em 5,00 mM de P; (G) Plantas cultivadas em 10,00 mM de P. Barra = 1 cm

Para o parâmetro número de folhas (Figura 15) as plantas crescidas na concentração com 1,25 mM de P apresentaram o maior número de folhas ($10,0 \pm 0,7$), enquanto na ausência do nutriente as plantas tiveram uma menor quantidade de folhas ($7,0 \pm 0,7$). Nas demais concentrações os resultados foram semelhantes entre eles (em torno de 9,0 folhas).

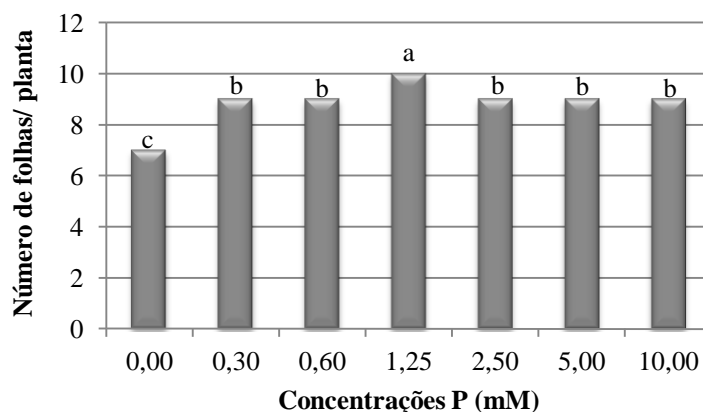


Figura 15. Número de folhas de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As alterações nas concentrações de P não influenciaram de forma significativa no tamanho da parte aérea. Os resultados foram estatisticamente iguais para as plantas crescidas nas concentrações de 0,30 a 10 mM de P, nestas concentrações as médias de comprimento variaram de 5,8 a 6,3 cm. A altura da parte aérea nas plantas mantidas na ausência de P foi de $2,9 \pm 0,3$ cm (Figura 16).

Outros trabalhos com bromélias envolvendo alterações na disponibilidade de P, também tiveram essa mesma resposta. Kanashiro (2005) ao estudar o efeito de diferentes concentrações de P na bromélia *A. blanchetiana* ($0,15 \leq P \leq 2,5 \text{ mM}$) não constatou diferenças entre os tratamentos em relação ao comprimento das folhas. A mesma tendência foi encontrada por Selemat & Ramlah (1993) com a bromélia *Ananas comosus* (L.) Merr., eles constataram que o aumento da quantidade de P ($0 \leq X \leq 12 \text{ kg de P}_2\text{O}_5/\text{ha}$) não influenciou, de forma significativa, no comprimento da parte aérea.

A diminuição no comprimento da parte aérea na ausência de P pode estar relacionada à restrição na captação de carbono (Grant *et al.*, 2001). Em cultivo de milho, a deficiência de P reduziu a taxa de emissão e crescimento das folhas, com redução da área foliar e conseqüente redução na captação de radiação solar, afetando o crescimento das raízes e diminuindo a capacidade de absorção de P pela planta.

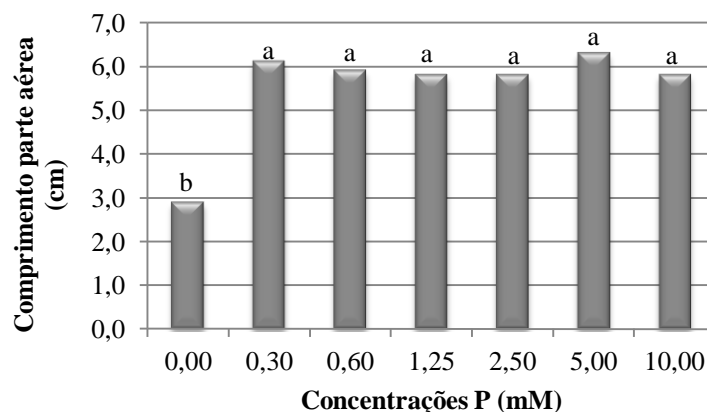


Figura 16. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise da quantidade de raízes (Figura 17) mostrou que as plantas mantidas nas menores concentrações de P tiveram um maior número de raiz, sendo que a concentração com 1,25 mM de P (equivalente ao MS completo) apresentou plantas com $12,0 \pm 0,7$ raízes. A menor quantidade de raízes foi observada nas plantas crescidas sem a presença de P (0 mM) e na que continha a maior concentração do nutriente (10 mM de P). Segundo Epstein & Bloom (2006) pode ocorrer um adensamento de raízes com o aumento desse macronutriente, pois ele pode favorecer a multiplicação das raízes. Resultado encontrado para *N. minutum* que apresentou plantas com maior quantidade de raízes conforme o incremento de P até a concentração contendo 1,25 mM de P.

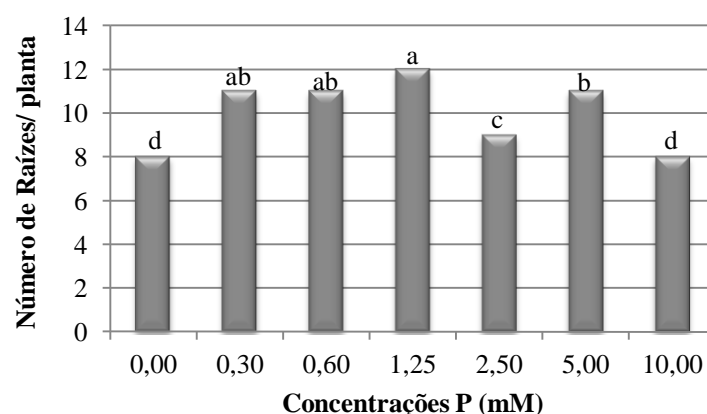


Figura 17. Número de raízes de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A maior média de comprimento radicular (Figura 18) resultou das plantas mantidas na concentração contendo 5 mM de P, apresentando $3,1 \pm 0,5$ cm. Segundo Blevins (1999) a ausência de P em algumas espécies pode resultar em raízes mais longas e finas que o normal. Resultado não encontrado em *N. minutum*, que apresentou raízes mais curtas.

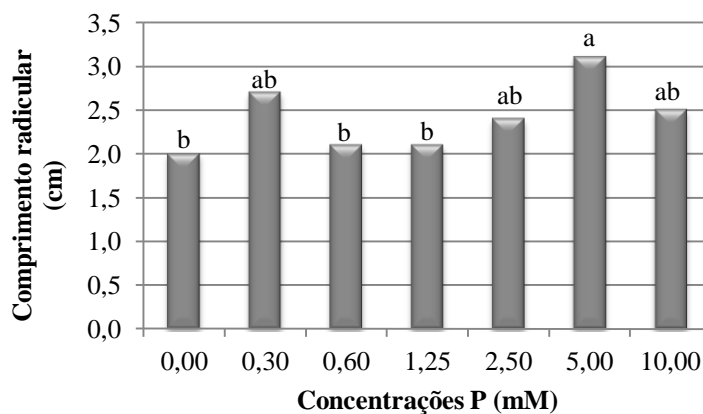


Figura 18. Comprimento radicular de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores das médias em relação ao acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea foram crescentes até 1,25 mM de P, decrescendo em 2,5 mM de P (199 ± 17 mg), voltando a aumentar em 5 mM de P (234 ± 26 mg), sendo que o menor acúmulo de massa ocorreu na ausência de P (69 ± 6 mg), apesar de, estatisticamente, não ter sido constatado diferenças entre 0,60 a 10 mM de P (Figura 19). Os resultados de massa seca (Figura 20) mostraram um aumento crescente até a concentração de 1,25 mM de P (20 ± 2 mg), mantendo-se, relativamente, estável até 5 mM de P, decaindo em seguida. Na concentração com 10 mM de P as plantas apresentaram uma menor quantidade de massa seca (12 ± 2 mg), sendo considerada estatisticamente igual às das plantas crescidas com 0,30 mM (12 ± 0 mg). Essa redução na biomassa em 10 mM de P pode sugerir certo grau de toxicidez do meio de cultura em função do excesso de sais.

Segundo Prado (2008), baixas concentrações de P resultam em menor acúmulo de massa seca da parte aérea, conforme se verificou em *N. minutum* nas concentrações 0,30 e 0,60 mM de P.

Calheiros *et al.* (2012), ao trabalharem com adubação fosfatada (0, 30, 60, 90, 120 e 150 kg.ha⁻¹) em duas variedades de cana-de-açúcar, observaram um aumento no acúmulo de matéria seca nas plantas adubadas com até 90 kg ha⁻¹. Fernandes *et al.* (2007), ao estudarem *Cordia goeldiana* Huber em diferentes concentrações de P (0, 150, 300 e 450 mg.dm⁻³)

constataram um aumento crescente na biomassa da parte aérea conforme o incremento do nutriente, assim como em *N. minutum* até a concentração contendo 1,25 mM de P.

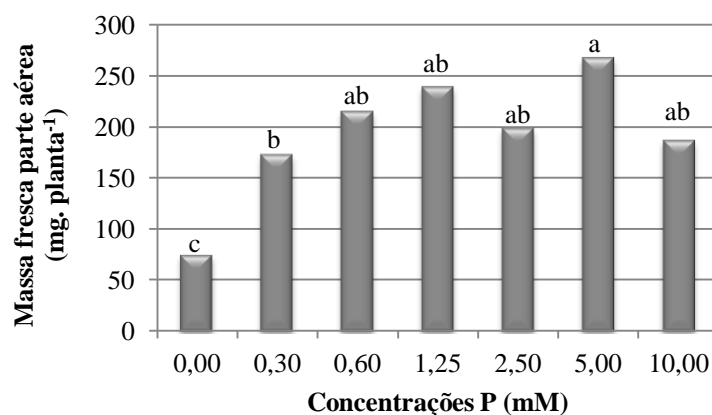


Figura 19. Massa fresca da parte aérea de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

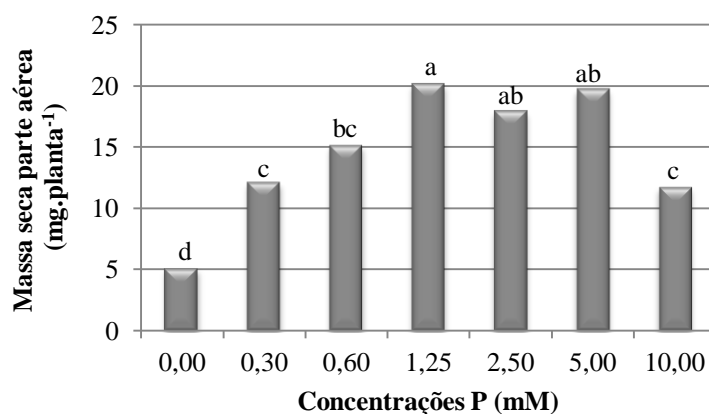


Figura 20. Massa seca da parte aérea de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de biomassa da parte radicular (Figuras 21 e 22) mostrou um crescimento mais acentuado das raízes nas plantas mantidas na concentração com 5 mM de P (42 ± 7 mg). Com exceção desta concentração, as plantas mantidas de 0,30 a 10 mM de P foram consideradas estatisticamente iguais para a análise de massa fresca com uma média de aproximadamente 20 mg. No entanto, com a análise de massa seca percebe-se uma tendência à redução na concentração 10 mM de P. As plantas mantidas na ausência do nutriente

apresentaram o menor acúmulo de biomassa com 6 ± 1 mg de massa fresca e 2 ± 1 mg de massa seca.

Em estudos semelhantes Russowski & Nicoloso (2003), trabalharam com a espécie *P. glomerata* e verificaram uma maior concentração de matéria seca da parte radicular nas plantas mantidas na concentração com 1,07 mM de P. Enquanto Kanashiro (2005) constatou um aumento crescente da massa seca, conforme o aumento do macronutriente na bromélia *A. blanchetiana* ($0 \leq N \leq 150\%$ de P).

Schumacher *et al.* (2003) ao estudarem o crescimento de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. em diferentes concentrações de P ($0 \leq P \leq 630$ mg.kg⁻¹), constataram que as doses de P influenciaram no acúmulo de biomassa até 360 mg.kg⁻¹, decrescendo nas concentrações maiores.

A espécie *N. minutum* apresentou um comportamento distinto destas espécies, pois obteve maior acúmulo de massa nas plantas cultivadas com 5 mM de P, sem que houvesse um aumento crescente como relatado por Kanashiro (2005) e Schumacher *et al.* (2003).

Stahl *et al.* (2013) verificaram a influencia de diferentes doses de P (0, 50, 100, 200 e 400 mg.dm⁻³) no acúmulo de massa seca de clones de *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage e constataram que as doses de P influenciaram no acúmulo de massa seca radicular, no entanto, para a espécie *E. benthamii* o acúmulo de massa aumentou linearmente conforme a adição de P, enquanto para a espécie *E. dunnii* o aumento na produção de massa seca ocorreu até 200 mg.dm⁻³, decrescendo em seguida.

Esses estudos demonstram que o aproveitamento do P no incremento celular das raízes pode variar conforme a espécie.

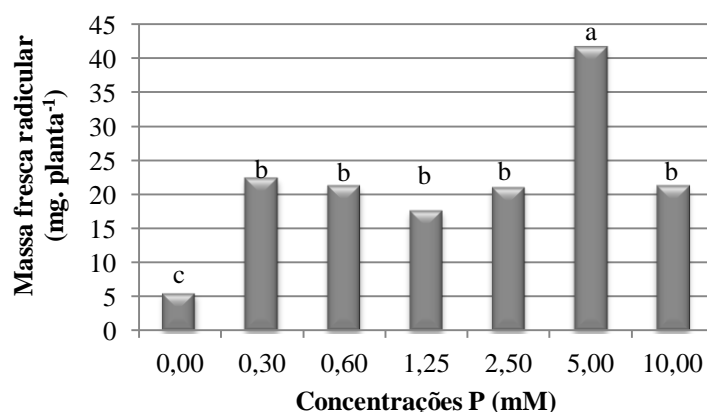


Figura 21. Massa fresca radicular de plantas *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

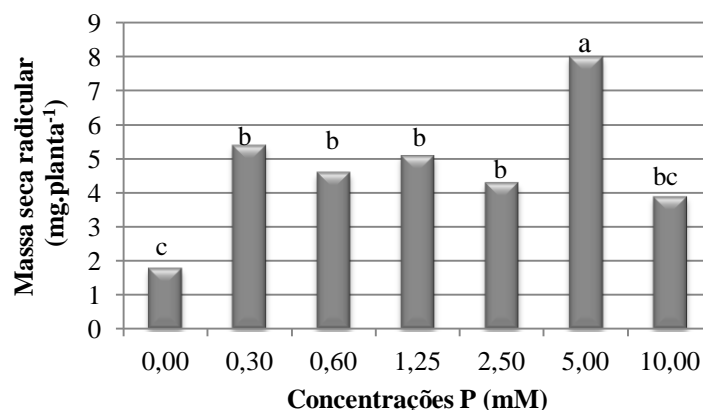


Figura 22. Massa seca radicular de plantas *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de pigmentos fotossintéticos mostrou que não existe uma concentração ideal de P que influencie na quantidade de clorofilas, apenas em 10 mM de P ocorreu uma diminuição nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos (Figura 23).

Silva *et al.* (2010) avaliaram se a disponibilidade de P no solo afetava a fotossíntese em plantas da espécie *Coffea arabica* L. utilizando três tratamentos (ausência do nutriente, 286 mg.kg⁻¹ e 572 mg.kg⁻¹ de P₂O₅) e após 70 dias de cultivo constataram que a maior concentração de pigmentos resultou dos cafeeiros cultivados com 572 mg.kg⁻¹ de P₂O₅. A ausência do P reduziu os teores de pigmentos fotossintéticos, apresentando os menores teores de clorofila a e b, carotenoides e xantofilas. Segundo os autores, a baixa disponibilidade de fósforo no solo compromete o crescimento de mudas do cafeeiro devido à disfunção no metabolismo fotossintético por limitações de origem estomática e metabólica.

A deficiência de P nos estádios iniciais de desenvolvimento de uma planta pode reduzir tanto a respiração como a fotossíntese (Grant *et al.* 2001). De acordo com Blevins (1999), altas concentrações de P prejudicam a adequada absorção de magnésio (Mg) pelas raízes e sua translocação para as folhas. O comprometimento da absorção do Mg pode resultar na diminuição da clorofila, uma vez que para sua formação são necessários quatro átomos de N e um átomo central de Mg (Prado, 2008). Com base nesses autores, é possível concluir que a diminuição na quantidade dos pigmentos fotossintéticos em *N. minutum* na concentração de 10 mM de P pode ter sido influenciada, principalmente, pela diminuição do Mg para as plantas.

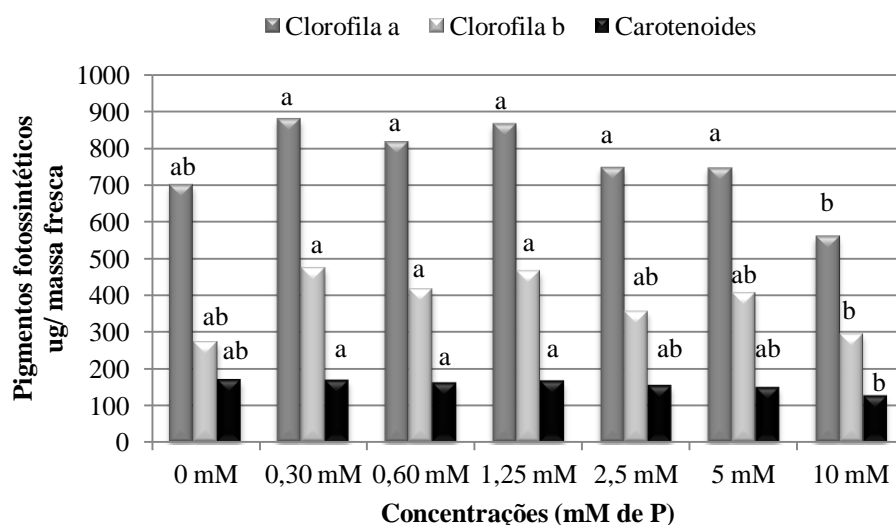


Figura 23. Pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) (μg / massa fresca) extraídos de plantas *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM de fósforo (P). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade

Com a análise de todos os resultados obtidos com as diferentes concentrações de P, foi possível constatar que a ausência do nutriente comprometeu o crescimento da espécie. As concentrações 5 e 10 mM não foram satisfatórias para o cultivo *in vitro* de *N. minutum*, pois apresentaram brotações e redução dos pigmentos fotossintéticos, respectivamente. Não houve uma concentração de máxima eficiência para o cultivo *in vitro* da espécie, dessa forma, sugere-se que as concentrações 0,60 e 1,25 mM de P sejam adequadas para a propagação da espécie.

4.4.3. Crescimento em diferentes concentrações de potássio (K)

As plantas cultivadas nas diferentes concentrações de potássio (K), assim como as mantidas nas diferentes concentrações de N e P, também apresentaram crescimento diferenciado após 180 dias de cultivo *in vitro* (Figura 14).

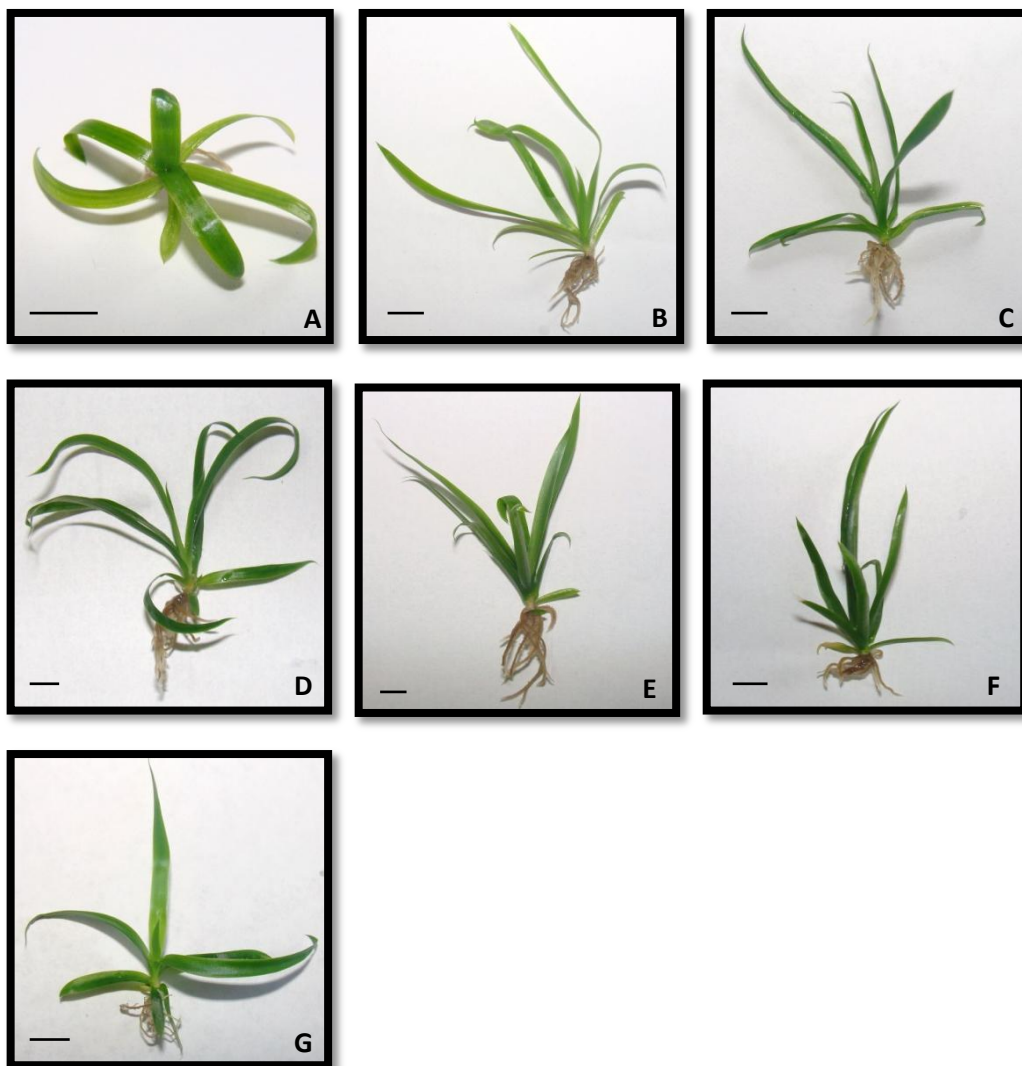


Figura 24. Aspecto das plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de K. (A) Plantas cultivadas em na ausência de K; (B) Plantas cultivadas em 1,88 mM de K; (C) Plantas cultivadas em 2,50 mM de K; (D) Plantas cultivadas em 5,00 mM de K; (E) Plantas cultivadas em 10,00 mM de K; (F) Plantas cultivadas em 20,00 mM de K; (F) Plantas cultivadas em 40,00 mM de K. Barra = 1 cm

A análise de número de folhas para as plantas mantidas nas diferentes concentrações de K resultou em aumento até a concentração de 5 mM de K, mantendo-se estável até 20 mM de K (com 10 folhas por planta) decrescendo em seguida (Figura 25).

Santos *et al.* (2005) analisaram o comportamento da espécie *Allium fistulosum* L. em diferentes concentrações de K (2,5 mmol L⁻¹, 5,0 mmol L⁻¹, 10 mmol L⁻¹ e 15 mmol L⁻¹ de KCl), ao final do experimento os autores constataram que as concentrações não influenciaram de forma significativa na quantidade de folhas por indivíduo.

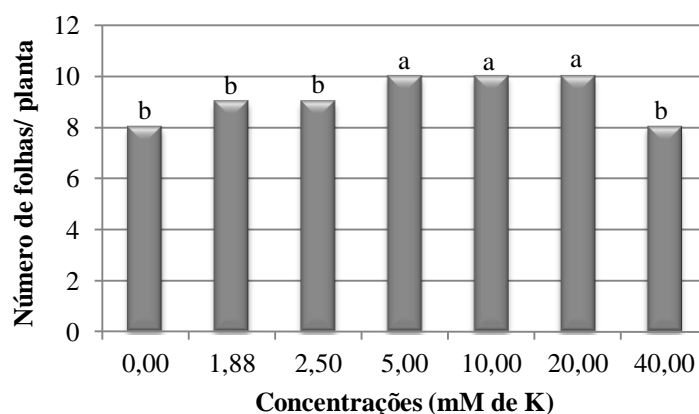


Figura 25. Número de folhas de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A ausência do K no meio comprometeu o crescimento da parte aérea (Figura 26). As plantas mantidas sem o nutriente apresentaram $2,2 \pm 0,4$ cm de altura e o maior comprimento ocorreu nas plantas mantidas na concentração com 5 mM de K ($7,0 \pm 0,7$ cm).

Figueiredo *et al.* (2008) estudaram o crescimento *in vitro* da orquídea *Cattleya loddigesii* em diferentes fontes de K (K₂SO₄ e KCl) nas concentrações 0, 125, 250, 375 e 500 mg.L⁻¹. Os autores fizeram várias combinações com essas concentrações e constataram que as plantas apresentaram um aumento crescente na altura da parte aérea até 500 mg.L⁻¹ de K₂SO₄, juntamente com 500 mg.L⁻¹ de KCl. Os autores sugerem que o efeito estimulante de K₂SO₄ poderia continuar em concentrações mais altas. Com base nesses resultados e nos encontrados em *N. minutum* sugere-se que a influência do K no crescimento da parte aérea pode depender da fonte e da concentração utilizada.

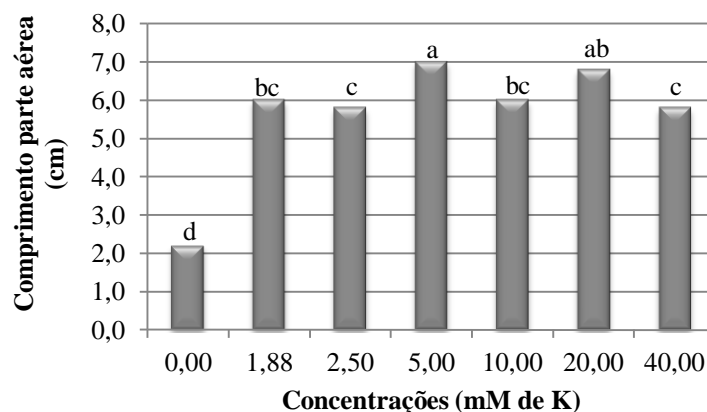


Figura 26. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao número de raízes, as plantas cultivadas na ausência do nutriente e em 40 mM de K foram as que apresentaram o menor número de raízes com $6,0 \pm 0,7$ e $9,0 \pm 0,7$, respectivamente. Para as demais concentrações a média foi de 10 raízes por planta (Figura 27).

Kanashiro (2005) em trabalho semelhante estudou o crescimento de *A. blanchetiana* em diferentes concentrações de K ($2,5 \leq K \leq 40$). O autor constatou um aumento no número de raízes conforme o acréscimo de potássio no meio. Tendência que difere da espécie *N. minutum* que apresentou redução na quantidade de raízes em 40 mM de K.

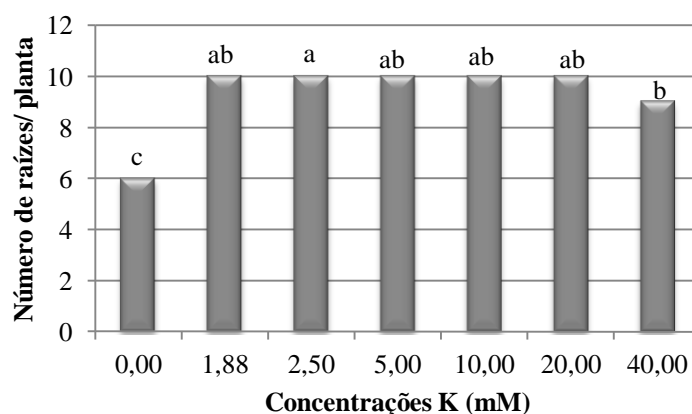


Figura 27. Número de raízes de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o comprimento radicular, houve um aumento crescente no comprimento das raízes com a adição de K no meio de cultura até a concentração de 5 mM de K ($3,2\pm 0,7$ cm), decrescendo nas demais concentrações (Figura 28). As plantas crescidas sem a fonte de K foram as que apresentaram as menores raízes ($0,9\pm 0,2$ cm), comparando esse resultado com os obtidos após 30 dias de cultivos ($0,6\pm 0,2$ cm), percebe-se que a ausência do K no meio de cultura comprometeu o crescimento do sistema radicular.

Kurita (2011) ao estudar a influência de diferentes concentrações de K ($0\leq K\leq 20$ mM) no crescimento de plantas *A. imperialis* constatou que as menores raízes resultaram do tratamento sem a presença de K, assim como ocorreu no presente estudo com plantas da espécie *N. minutum*. Para as demais concentrações a autora verificou que o comprimento radicular aumentou com o incremento do nutriente, sem apresentar diferenças significativas. Diferentemente dos resultados obtidos com *N. minutum* que apresentaram diferenças entre as concentrações.

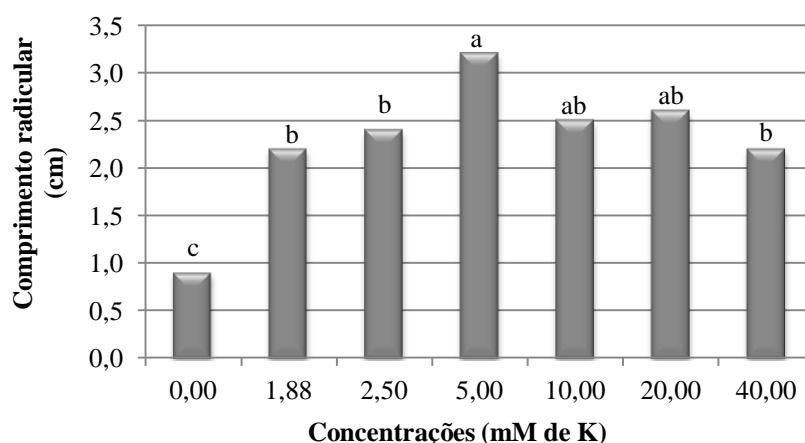


Figura 28. Comprimento radicular (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A adição de K no meio não influenciou na biomassa das plantas. A menor quantidade de massa ocorreu nas plantas mantidas na ausência do nutriente com 46 ± 6 mg de massa fresca e $3,2\pm 0$ mg de massa seca. Para as demais concentrações não foi constatado diferenças significativas (Figuras 29 e 30).

Santos *et al.* (2008) ao estudarem a influência de fontes de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0, 250, 500 e 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e KCl 0, 125, 250, 500 e 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) na multiplicação *in vitro* de crisântemo, constataram que o aumento nas concentrações de fosfato de potássio promoveu o ganho de matéria fresca e seca da parte aérea. Sendo que o maior acúmulo de biomassa

ocorreu nas plantas cultivadas no meio que continha 1000 mg.L^{-1} de fosfato de potássio com 250 mg.L^{-1} de cloreto de potássio.

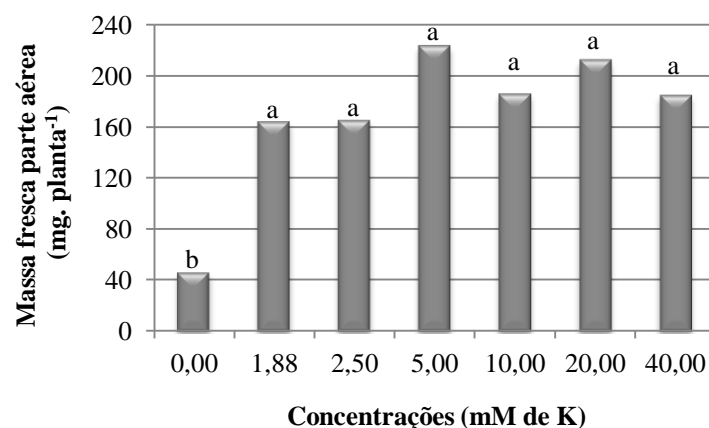


Figura 29. Massa fresca parte aérea (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

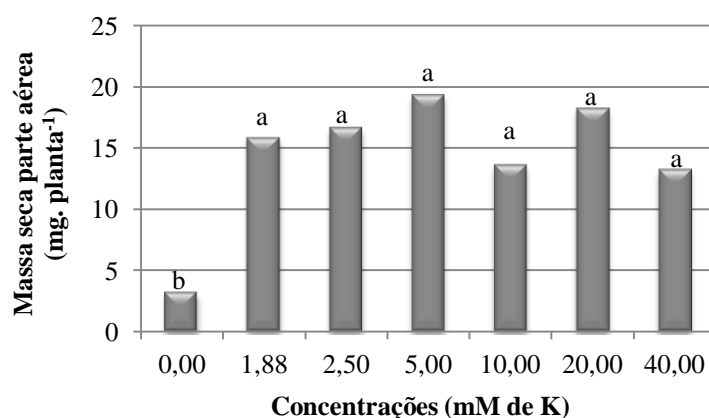


Figura 30. Massa seca parte aérea (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a análise da massa fresca radicular não houve uma concentração mais eficiente e sim uma faixa que compreende as concentrações de 1,88 a 20 mM de K.

As plantas mantidas na ausência de K tiveram o menor acúmulo de massa fresca (6 ± 1 mg), seguido pela concentração contendo 40 mM de K (20 ± 1 mg), para as demais concentrações os resultados ficaram entre 40 e 46 mg (Figura 31).

Com a análise de massa seca radicular foi possível perceber que as plantas mantidas nas concentrações 1,88, 2,50, 10 e 20 mM de K tiveram um maior acúmulo de água, sendo o

crescimento radicular maior para os indivíduos mantidos na concentração com 5 mM de K (6 ± 1 mg) (Figura 32).

Kurita (2011) estudando a espécie *A. imperialis* ($0 \leq K \leq 40$ mM) não encontrou diferenças estatísticas para a quantidade de massa fresca radicular entre as concentrações 1,88 a 20 mM de K, assim como a espécie *N. minutum*. No entanto, para a espécie *A. imperialis* os resultados se mantiveram os mesmos na análise de massa seca, ao contrário dos resultados encontrados para a *N. minutum* que obteve resultado maior em 5 mM de K. A autora também constatou menor acúmulo de biomassa na ausência deste nutriente.

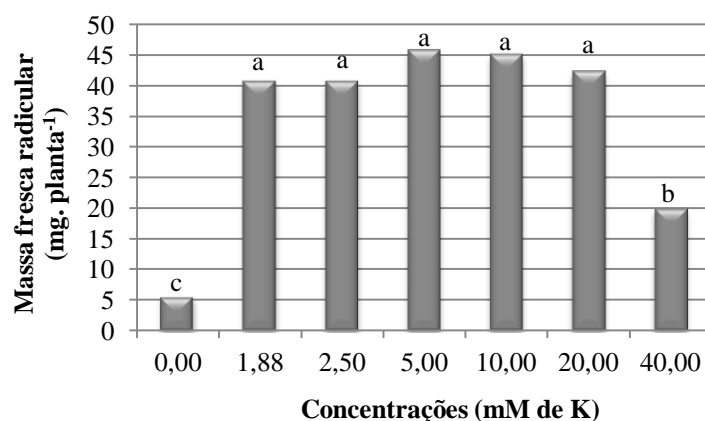


Figura 31. Massa fresca radicular (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

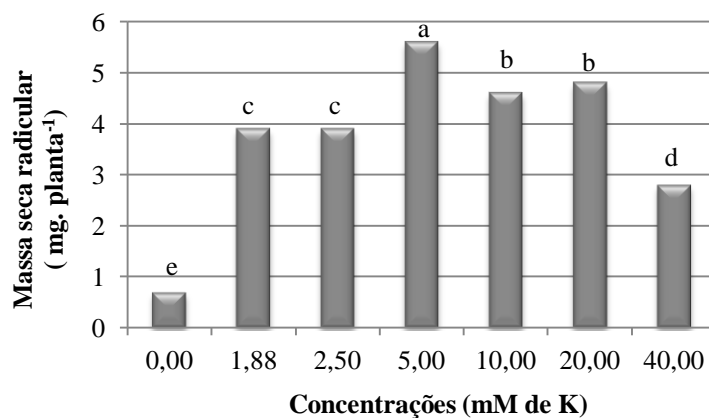


Figura 32. Massa seca radicular (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, as plantas mantidas na concentração 5 mM de K apresentaram as maiores médias com 1248,256 μg de clorofila a.g⁻¹MF, 624,718 μg de

clorofila b.g⁻¹MF e 282,017 µg de carotenoides.g⁻¹MF e a menor média ocorreu na ausência do nutriente (747,867 µg de clorofila a.g⁻¹MF, 265,785 µg de clorofila b.g⁻¹MF e 220,512 µg de carotenoides.g⁻¹MF), apesar de não ter sido constatado diferenças estatísticas entre as concentrações de 1,875 a 20 mM de K. (Figura 33).

Essa redução nos teores de clorofila na ausência do potássio pode estar relacionada com a diminuição de cloroplasto. Segundo Prado (2008), a redução no fornecimento de K ao vegetal resulta em destruição dos cloroplastos, tendo como consequência a redução dos pigmentos fotossintéticos. De acordo com o mesmo autor, quando o nutriente está em excesso pode comprometer a absorção de outros nutrientes, e se houver a redução na absorção de Mg também pode ocorrer à redução dos pigmentos, por esse cátion fazer parte da molécula de clorofila.

A ausência do K comprometeu de forma significativa o crescimento da espécie, apresentando os menores valores nas análises biométricas, biomassa e pigmentos fotossintéticos, comparando-se com as demais concentrações.

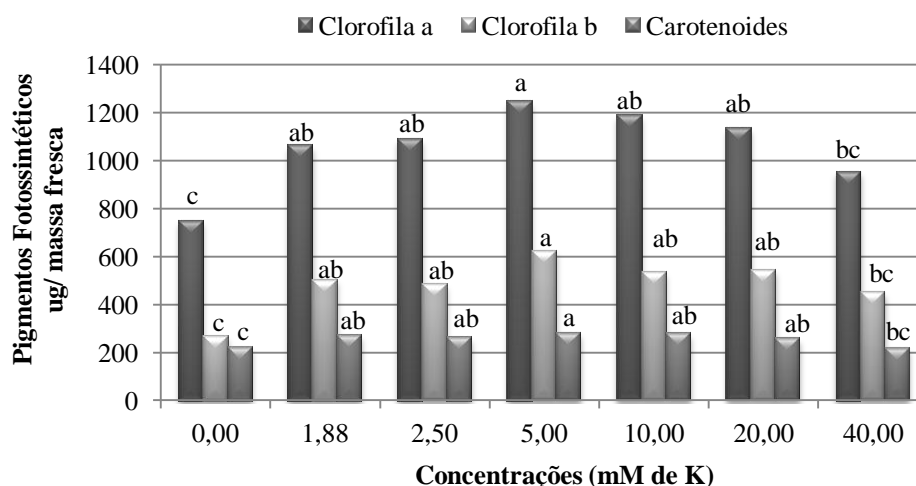


Figura 33. Pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides)(µg/ massa fresca) extraídos de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM de potássio (K). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com base em todos os parâmetros analisados e no aspecto geral das plantas constatou-se que as concentrações de 5 a 20 mM de K são favoráveis ao crescimento, no entanto, sugere-se que a concentração com 10 mM de K seja utilizada para o cultivo *in vitro* da espécie *N. minutum* por ser uma concentração intermediária dentre as que apresentaram os melhores resultados.

4.4.4. Crescimento em diferentes concentrações de cálcio (Ca)

As plantas cultivadas nas diferentes concentrações de cálcio (Ca), assim como as mantidas nas diferentes concentrações de N, P e K, também apresentaram crescimento diferenciado após 180 dias de cultivo *in vitro* (Figura 34).

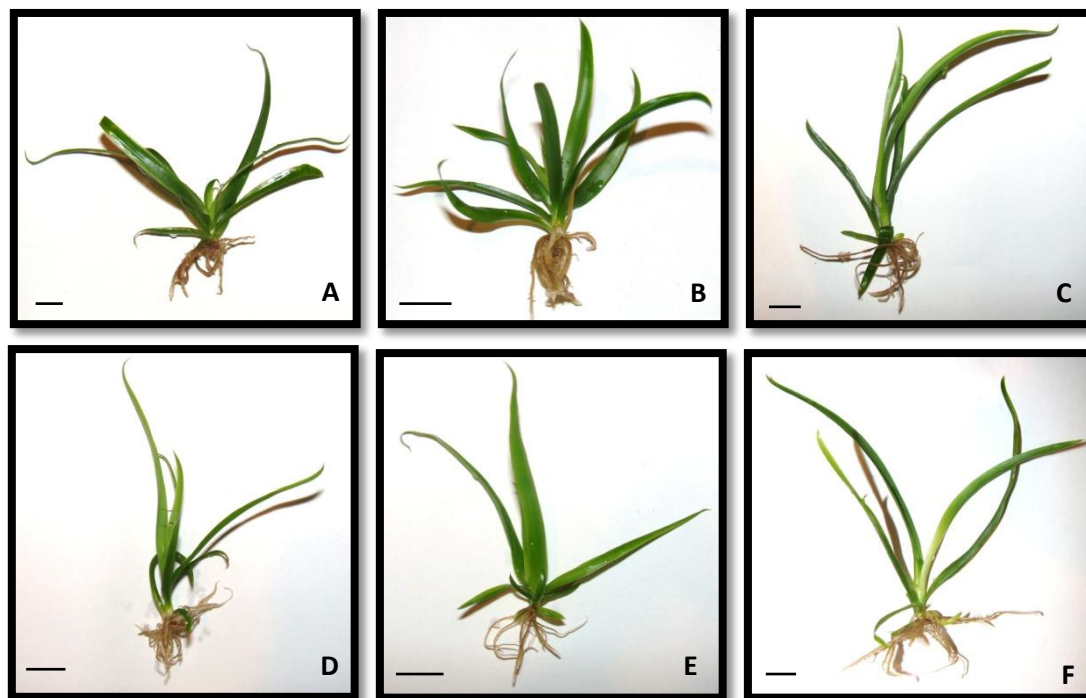


Figura 34. Aspecto das plantas *Nidularium. minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de Ca. (A) Plantas cultivadas em na ausência de Ca; (B) Plantas cultivadas em 0,75 mM de Ca; (C) Plantas cultivadas em 1,50 mM de Ca; (D) Plantas cultivadas em 3,00 mM de Ca; (E) Plantas cultivadas em 4,50 mM de Ca; (F) Plantas cultivadas em 6,00 mM de K. Barra = 1 cm

Para a análise do número de folhas o aumento na concentração de Ca até 4,5 mM não influenciou nos resultados. As plantas mantidas nestas concentrações apresentaram uma média de 09 folhas por planta. A concentração com 6 mM de Ca, apresentou plantas com as menores quantidades de folhas ($7,8 \pm 0,8$ folhas por planta) (Figura 35).

Kanashiro *et al.* (2009) ao trabalharem com a bromélia *A. blanchetiana* sob diferentes concentrações de Ca e Kurita (2011) em estudo com a bromélia *A. imperialis*, também sob diferentes concentração de Ca, constataram que o aumento nas concentrações desse nutriente não influenciou de forma significativa na quantidade de folhas. Resultados que corroboram com os encontrados com a espécie *N. minutum*.

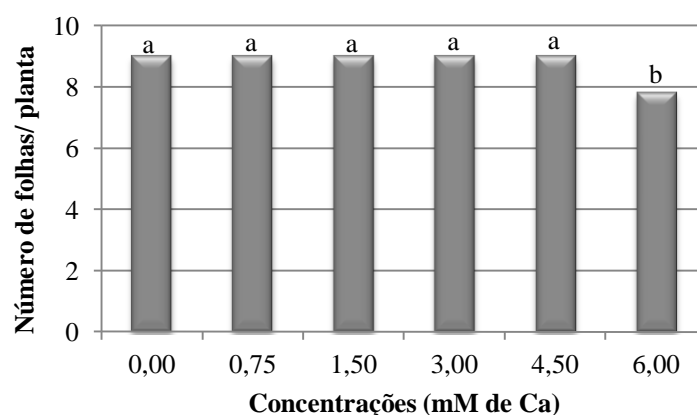


Figura 35. Número de folhas de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O comprimento da parte aérea apresentou diferenças significativas conforme o incremento do nutriente. As plantas mantidas nas concentrações de 1,50, 3 e 6 mM de Ca apresentaram folhas mais compridas com $8,1 \pm 0,7$ cm, $7,4 \pm 0,7$ cm e $7,8 \pm 0,6$ cm, respectivamente (Figura 36).

Takane *et al.* (1994) ao analisarem a influência do CaCl_2 (440, 880, 1,760, 2,640 e 3,520 mg.L^{-1}) na micropropagação de explantes da espécie *Gypsophila paniculata* L., constataram que as plantas com maior parte aérea foram as cultivadas em 1,760 mg.L^{-1} de CaCl_2 (concentração quatro vezes maior do que a presente no meio MS). Segundo os autores o uso do meio MS (440 mg.L^{-1} de CaCl_2) não foi satisfatório para o crescimento da espécie por apresentar alto índice de estiolamento, ao contrário do observado na espécie *N. minutum* que apresentou resultados satisfatórios para esta concentração, em relação ao comprimento da parte aérea.

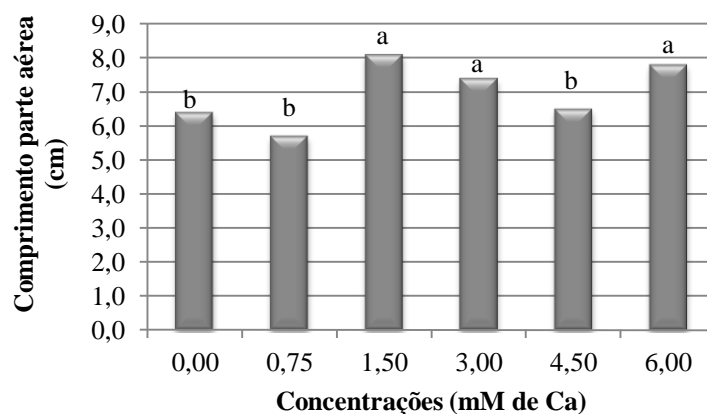


Figura 36. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas da espécie *Nidularium minutum* após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao número de raízes, as alterações na quantidade de Ca não resultaram em grandes diferenças (Figura 37). As médias ficaram entre 09 e 10 raízes por planta, tendo apresentado a maior média as plantas mantidas na concentração com 3 mM de Ca ($11,0 \pm 0,6$), (apesar de não ter apresentado diferenças estatísticas nas concentrações de 0,00, 0,75 e 6,00 mM de Ca), enquanto as mantidas em 4,50 mM de Ca apresentaram menos raízes ($9,0 \pm 0,4$).

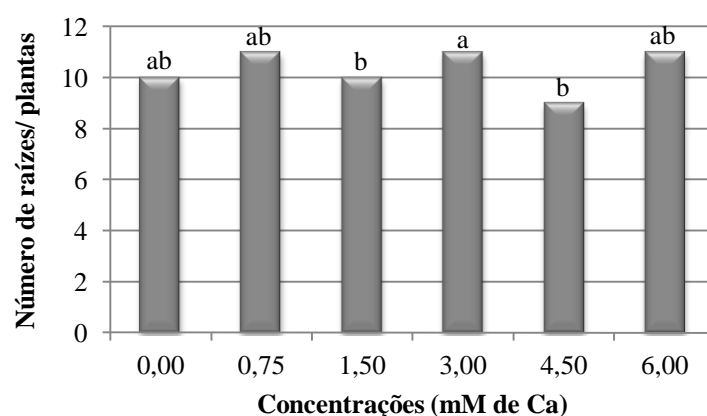


Figura 37. Número de raízes de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O comprimento radicular (Figura 38) das plantas mantidas em 1,5 mM de Ca foi, em valor médio, maior se comparado aos demais tratamentos, apresentando uma média de $3,3 \pm 0,6$ cm, apesar de não ter apresentado diferenças estatísticas com os demais tratamentos (exceção da concentração de 0,75 mM de Ca) (Figura 38). Segundo Prado (2008), em baixa disponibilidade de Ca ocorre uma maior produção de etileno que pode estimular a formação de raízes, fato que parece não ter ocorrido com *N. minutum*.

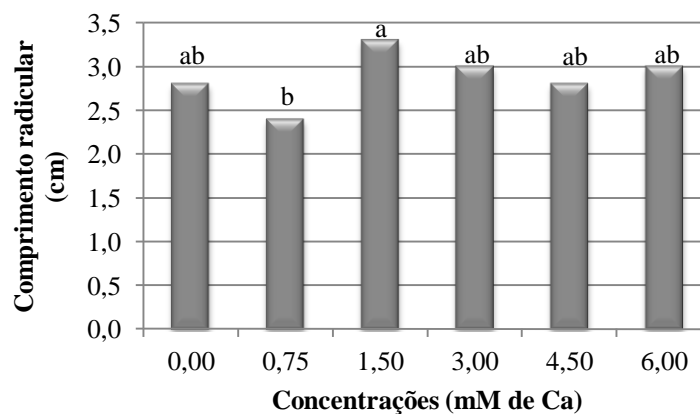


Figura 38. Comprimento radicular (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à massa da parte aérea, constatou-se que a concentração contendo 1,5 mM de Ca favoreceu o incremento celular das folhas com 295 ± 30 mg de massa fresca e 26 ± 3 mg de massa seca. As plantas cultivadas sem a presença de Ca apresentaram o menor acúmulo de massa tanto fresca como seca com 236 ± 16 mg e 16 ± 1 mg, respectivamente. Para as demais concentrações, os resultados foram estatisticamente iguais, apresentando uma média de 200 mg de massa fresca e 19 mg de massa seca (Figuras 39 e 40).

Aranda-Peres *et al.* (2009) ao trabalharem com três espécies de bromélias (*V. friburguensis*, *V. hieroglyphica* e *V. unilateralis*) em diferentes concentrações de Ca (1,5 mM, 3 mM, 6 mM e 12 mM) constataram que os indivíduos cultivados em 12 mM de Ca apresentaram um maior acúmulo de massa tanto fresca quanto seca. Esse aumento no crescimento da parte aérea foi constatado nas três espécies.

Para Kurita (2011) em trabalho semelhante com a espécie *A. imperialis* em diferentes concentrações de Ca (0, 0,75, 1,5, 3 e 6 mM) a concentração que apresentou maior média para o parâmetro massa seca foi a que continha 4,5 mM de Ca.

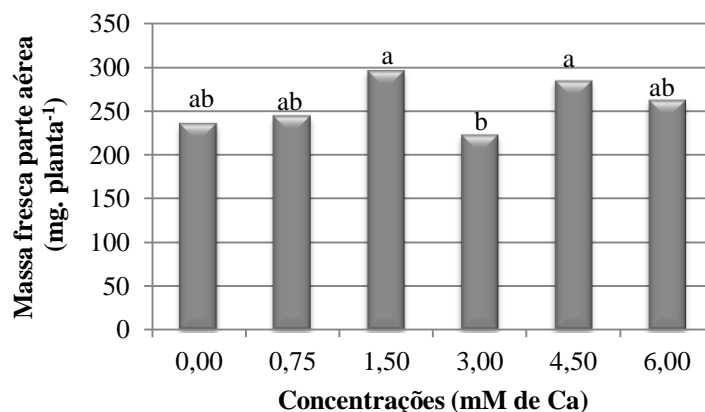


Figura 39. Massa fresca da parte aérea (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

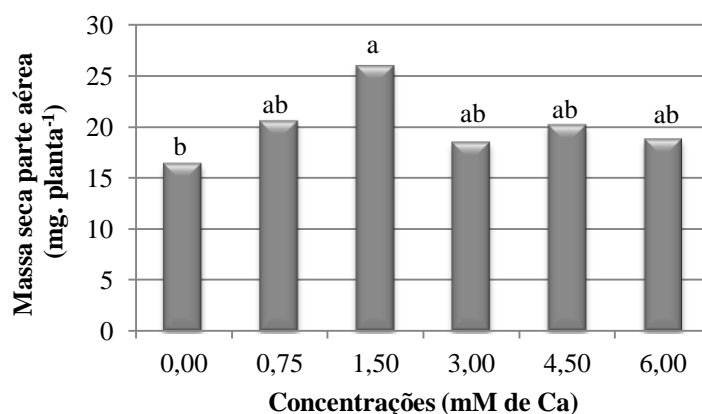


Figura 40. Massa seca da parte aérea (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise da biomassa radicular (Figuras 41 e 42) demonstrou não ter havido diferenças entre os tratamentos 0,75 a 6 mM de Ca, tendo sido observado apenas uma média maior de massa fresca nas plantas mantidas na concentração com 4,5 mM de Ca com 78 ± 20 mg e para massa seca a média foi maior em 3 mM de Ca com 8 ± 1 mg. Para o parâmetro massa fresca as plantas mantidas na ausência de Ca apresentaram menor acúmulo de massa, no entanto, após o processo de secagem das raízes constatou-se que o incremento celular foi semelhante às demais concentrações.

Silva *et al.* (2011) ao trabalharem com a espécie *Phaseolus vulgaris* L. cv. Talismã em concentrações crescentes de Ca (0, 25, 50, 100 e 200 mg.dm⁻³), constataram que a concentração que mais favoreceu o crescimento das raízes foi 100 mg.dm⁻³ (concentração

próxima a 0,75 mM de Ca). Para a espécie *N. minutum* a alteração nas concentrações de Ca não apresentou diferenças no crescimento radicular.

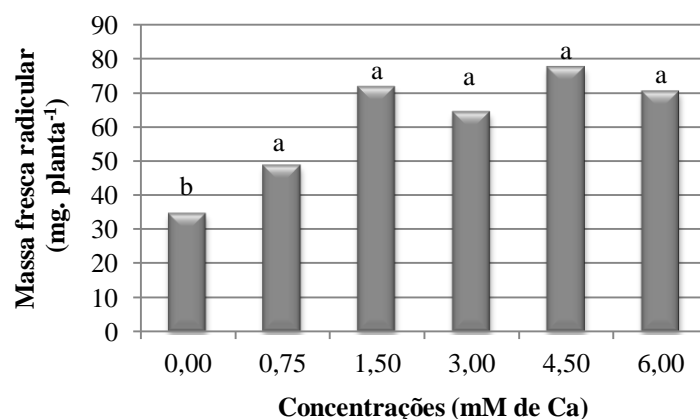


Figura 41. Massa fresca radicular (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

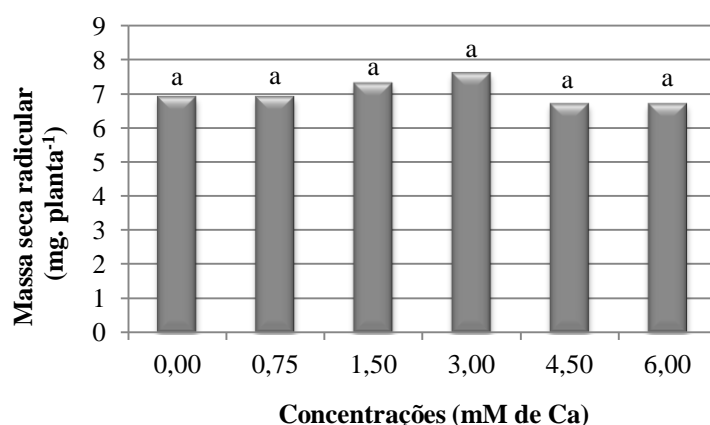


Figura 42. Massa seca radicular (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade

A análise dos pigmentos fotossintéticos demonstrou que o maior acúmulo ocorreu nas plantas mantidas na concentração contendo 1,50 mM de Ca. A concentração de pigmentos foi elevada, mesmo nas plantas mantidas sem o nutriente, sendo semelhante aos resultados obtidos nas concentrações 0,75 e 3 mM de Ca. Os resultados obtidos nas concentrações com 4,50 mM e de 6 mM de Ca demonstram que as plantas tiveram uma redução nos teores dos pigmentos (Figura 43).

Kurita *et al.* (2011) ao realizarem trabalho semelhante com a espécie *A. imperialis* (bromélia saxícola) não constataram diferenças significativas entre as concentrações utilizadas

($0 \leq \text{Ca} \leq 6 \text{mM}$). Resultado que difere da espécie em estudo, que é de hábito terrícola, que apresentou redução nas concentrações de clorofilas e carotenoides a partir de 4,5 mM de Ca.

De acordo com Casarini (2004) a absorção de Ca pelas raízes é fortemente influenciada pela concentração de K na zona radicular, devido ao efeito antagonista entre os íons. Quando o íon Ca^{2+} está presente no solo em baixas concentrações ocorre uma maior absorção de íons K^+ pelas plantas, ao contrário, ou seja, quando o Ca está presente em altas concentrações a absorção do K é reduzida. A partir dessas informações sugere-se que a redução nos teores de pigmentos fotossintéticos nas concentrações 4,5 e 6 mM de Ca ocorreu em função do excesso de Ca no meio que comprometeu a absorção do íon K^+ (Guerreiro *et al.*, 2012). Conforme citado anteriormente, a deficiência de K ao vegetal pode resultar na redução da capacidade fotossintética, devido à destruição de cloroplastos.

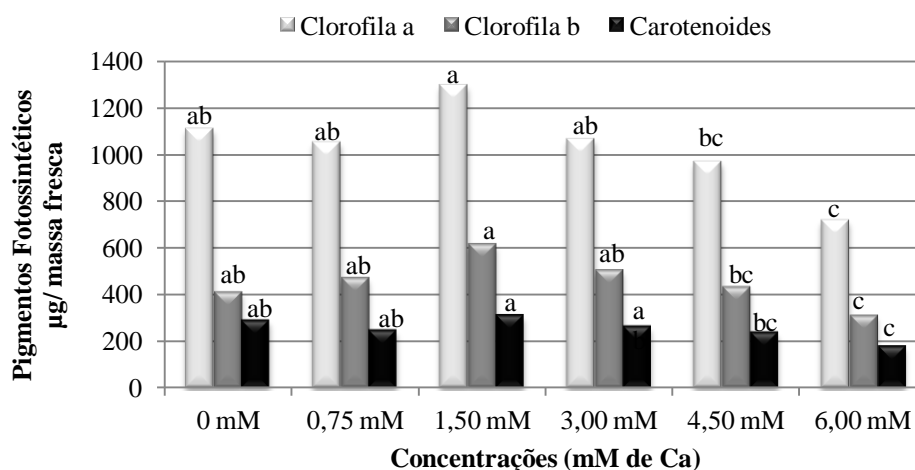


Figura 43. Pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides) (µg/ massa fresca) extraídos de plantas da espécie *Nidularium minutum* após 180 dias de cultivo *in vitro* nas concentrações 0; 0,75; 1,50; 3,00; 4,50 e 6,00 mM de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, as alterações nas concentrações de Ca não resultaram em grandes alterações no crescimento das plantas de *N. minutum*. Esses resultados podem estar relacionados ao fato deste cátion ter pouca mobilidade e ser absorvido apenas pelas raízes jovens por não estarem suberizadas, sem estrias de Caspary, ou ainda, por competição com outros íons como NH_4^+ , K^+ e Mg^{+2} que em altas concentrações podem diminuir a absorção do Ca (Malavolta, 2006; Prado, 2008).

Com base nos resultados obtidos e análise das plantas, sugere-se que a concentração contendo 1,5 mM de Ca seja a mais indicada para o crescimento da espécie *N. minutum* sob cultivo *in vitro*.

4.5. Resumo dos principais resultados

Os resultados obtidos nos tratamentos com as diferentes concentrações de N, P, K e Ca demonstraram que a espécie *N. minutum* respondeu as alterações de sais no meio MS, conforme o esperado. Entretanto, alguns parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as concentrações, mas ao analisar o aspecto geral das plantas, de forma individualizada, foi possível constatar algumas alterações morfológicas, possivelmente influenciadas pela disponibilidade de nutrientes.

Em relação à parte aérea, algumas plantas apresentaram diferenças na textura das folhas, algumas eram extremamente delgadas, enquanto outras a parte aérea era formada por folhas mais espessas, algumas apresentavam um aspecto murcho. Algumas concentrações influenciaram na presença e no tamanho dos espinhos presentes nas margens das folhas.

Diferenças no sistema radicular também foram verificadas, como alterações na coloração, espessura e variação na presença de pelos absorventes.

Em todas as concentrações dos quatro tratamentos as plantas apresentaram senescência foliar, e em algumas concentrações como 120 e 175 mM de N, 2,5 e 5 mM de P e 4,5 e 6 mM de Ca houve a ocorrência de brotações.

De modo geral, a deficiência nos macronutrientes por 180 dias comprometeu o crescimento das plantas, porém só resultou em morte de indivíduos na ausência de K. A morte de plantas no tratamento que não continha K pode estar relacionada com a importância deste nutriente na ativação de enzimas e movimento estomático (Prado, 2008). O íon K^+ está envolvido na ativação de várias enzimas como quinases e sintetases e quando presente no vacúolo eleva o potencial osmótico das células-guarda, resultando em absorção de H_2O , aumentando o turgor e ocasionando a abertura dos estômatos.

Andrade & Tamaki (2012) estudaram a influência do N, P e K no crescimento da espécie *N. minutum* cultivadas *in vitro* e constataram que a ausência desses macronutrientes no meio de cultura reduziu de forma significativa o crescimento das plantas. Os autores verificaram que o N foi o nutriente que mais comprometeu o crescimento das plantas, resultando em plantas 8 vezes menores em relação as plantas cultivadas em MS completo. Neste estudo também verificou-se que as plantas cultivadas sob ausência do N apresentaram um maior comprometimento do crescimento quando comparadas as plantas crescidas sob deficiência de P e K.

Constatou-se que o crescimento foi comprometido nas concentrações contendo 120 e 175 mM de N, 10 mM de P e 40 mM de K. Segundo Taiz & Zeiger (2013) quando os minerais presentes no solo estão em excesso, este se torna salino e o crescimento das plantas,

de modo geral, é reduzido, podendo levar o vegetal à morte, sendo assim, podemos sugerir que a redução no crescimento das plantas mantidas nesses tratamentos pode ter ocorrido pelo excesso de sais no meio.

Em relação às melhores concentrações, as plantas mantidas no meio contendo 60 mM de N formaram um lote homogêneo, apresentando poucas folhas senescentes com uma média de 1,0 folha por planta, raízes com aproximadamente 1 mm de espessura e folhas com coloração bem escura, devido ao acúmulo de pigmentos fotossintéticos.

Para o tratamento contendo alteração na disponibilidade de P, a concentração com 0,60 mM de P apresentou plantas bem uniformes. O lote tinha poucas plantas pequenas e pouca senescência foliar com uma média de 1,3 folhas por planta. No geral, as plantas estavam com uma boa relação raiz/ parte aérea. As plantas mantidas no meio contendo 1,25 mM de P apresentaram características bem semelhantes às plantas crescidas em 0,60 mM de P. A média de senescência foliar também foi de 1,3 folhas por planta, esse lote apresentou folhas bem maleáveis e sistema radicular bem formado.

As plantas mantidas em meio contendo 10 mM de K apresentaram folhas mais finas, raízes com coloração clara e não muito compridas, no entanto, apresentaram uma boa relação raiz/ parte aérea. Houve pouca senescência foliar, apenas 0,9 folhas por planta, sem nenhuma morte.

As plantas cultivadas no meio contendo 1,5 mM de Ca apresentaram folhas com textura mais maleável, raízes grossas e uma média de 1,3 folhas senescentes por planta. Assim como as plantas das demais concentrações, as pertencentes a esse lote também apresentaram alteração na coloração das folhas mais jovens, fato que pode estar relacionado à baixa mobilidade do mineral.

Quando comparamos as melhores concentrações através dos parâmetros de crescimento é possível perceber que as plantas mantidas no tratamento contendo 1,5 mM Ca apresentaram resultados superiores aos demais tratamentos (Figuras 44, 45, 46, 47 e 48).

Em relação à quantidade de folhas, as plantas crescidas em 1,25mM de P apresentaram a maior quantidade com $12,0 \pm 0,7$ folhas, a menor quantidade ocorreu nas plantas mantidas no tratamento contendo 60 mM de N com $10,0 \pm 0,5$ folhas por planta (Figura 44). As plantas que apresentaram o maior comprimento foliar e acúmulo de massas (Figura 45 e 46) foram as mantidas no meio que continha 1,5 mM de Ca com $7,6 \pm 0,7$ cm, 285 ± 56 mg de massa fresca e 24 ± 7 mg de massa seca.

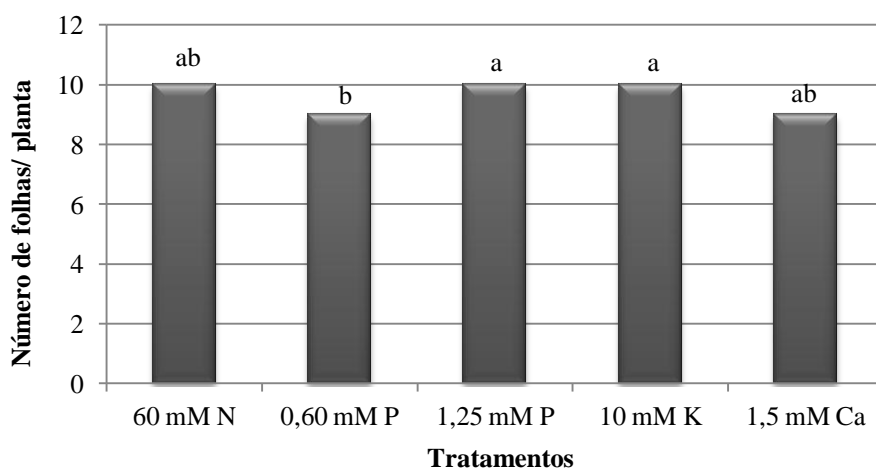


Figura 44. Número de folhas de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos contendo 60 mM de nitrogênio (N), 0,60 e 1,25 mM de fósforo (P), 10 mM de potássio (K) e 1,5 de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

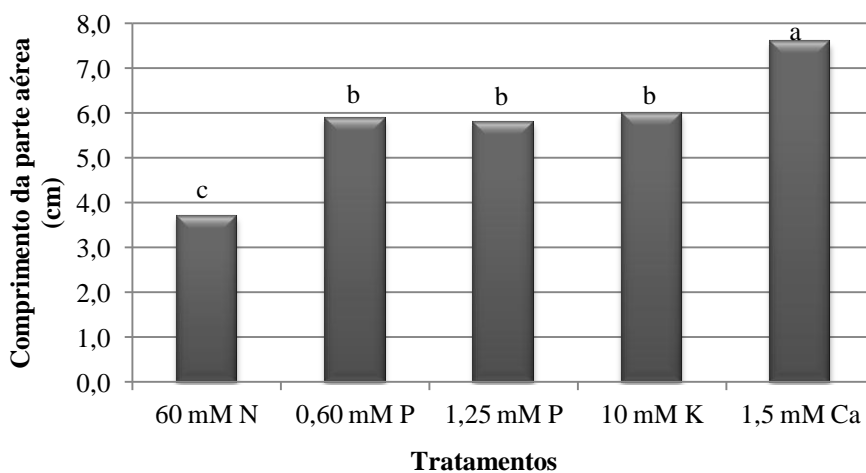


Figura 45. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos contendo 60 mM de nitrogênio (N), 0,60 e 1,25 mM de fósforo (P), 10 mM de potássio (K) e 1,5 de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

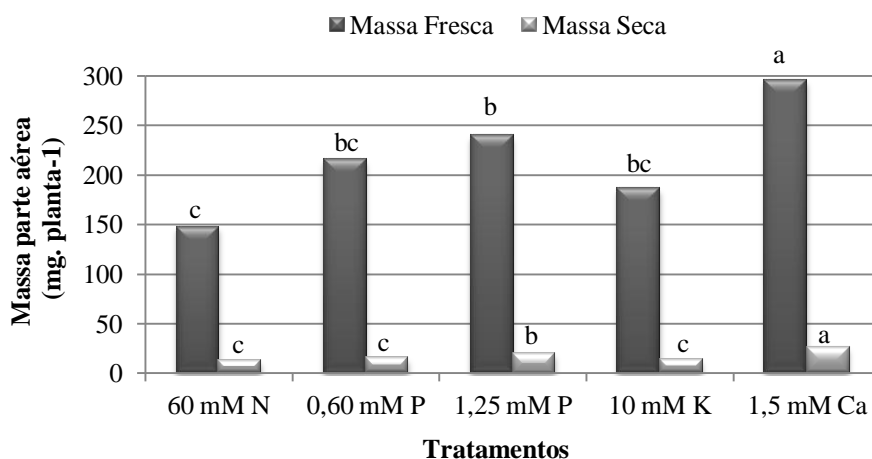


Figura 46. Massa fresca e seca da parte aérea (mg.planta⁻¹) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos contendo 60 mM de nitrogênio (N), 0,60 e 1,25 mM de fósforo (P), 10 mM de potássio (K) e 1,5 de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os parâmetros relacionados ao sistema radicular as plantas mantidas no tratamento com 1,25 mM de P foram as que apresentaram o maior número de raízes (12,0±0,7), sendo o menor número resultante das plantas crescidas no tratamento com 60 mM de N (9,0±0,7) (Figura 47). Em relação ao comprimento radicular (Figura 48) as plantas que permaneceram no tratamento com 1,5 mM de Ca apresentaram raízes mais longas com 3,5±0,8 cm. As plantas mantidas nos demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas para esse parâmetro. O maior acúmulo de massa fresca e seca (Figura 49) resultou das plantas mantidas em 1,5 mM de Ca com 285±24 mg e 58±8 mg, respectivamente.

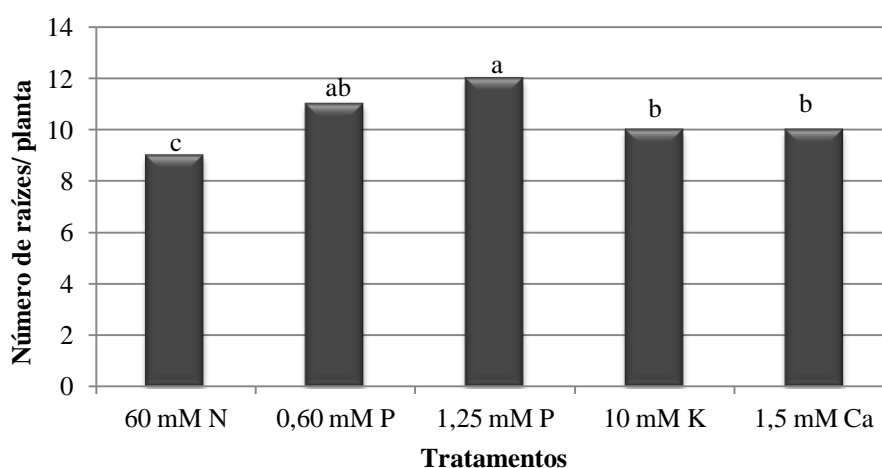


Figura 47. Número de raízes de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos contendo 60 mM de nitrogênio (N), 0,60 e 1,25 mM de fósforo (P), 10 mM de potássio (K) e 1,5 de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

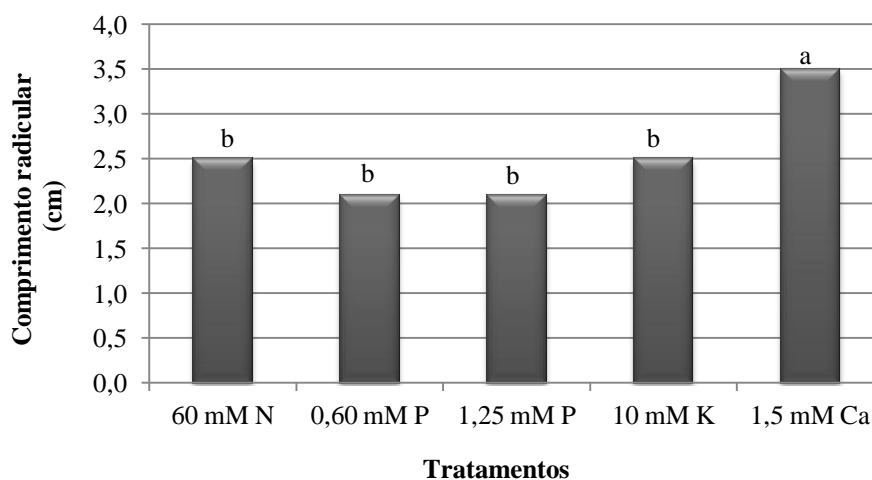


Figura 48. Comprimento radicular (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos contendo 60 mM de nitrogênio (N), 0,60 e 1,25 mM de fósforo (P), 10 mM de potássio (K) e 1,5 de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

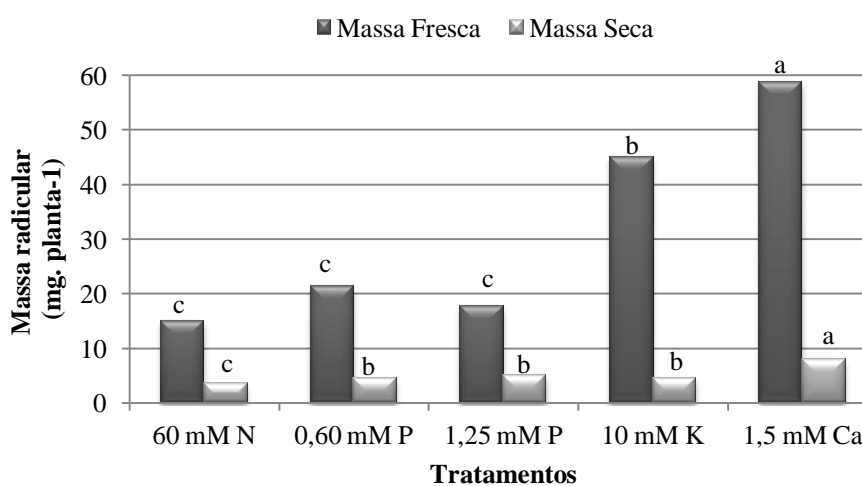


Figura 49. Massa fresca e seca radicular (mg.planta⁻¹) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos contendo 60 mM de nitrogênio (N), 0,60 e 1,25 mM de fósforo (P), 10 mM de potássio (K) e 1,5 de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O maior acúmulo de pigmentos fotossintéticos para as plantas mantidas nos melhores tratamentos de N, P, K e Ca resultaram do tratamento com 1,5 mM de Ca (1296,47 μg de clorofila a.g⁻¹MF, 611,36 μg de clorofila b.g⁻¹MF e 306,18 μg de carotenoides.g⁻¹MF), seguido das plantas mantidas em 10 mM de K (1186,51 μg de clorofila a.g⁻¹MF, 535,92 μg de clorofila b.g⁻¹MF e 277,95 μg de carotenoides.g⁻¹MF) (Figura 50).

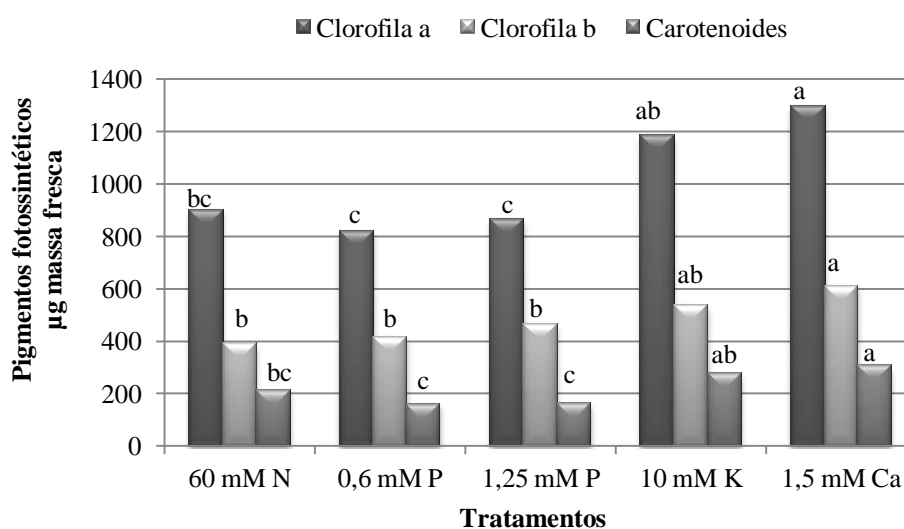


Figura 50. Pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides) (μg / massa fresca) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* tratamentos contendo 60 mM de nitrogênio (N), 0,60 e 1,25 mM de fósforo (P), 10 mM de potássio (K) e 1,5 de cálcio (Ca). Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O crescimento diferenciado das plantas cultivadas em 1,5 mM de Ca pode ter resultado da interação dos nutrientes presentes nesta concentração. Comparando a formulação deste meio aos demais tratamentos verificou-se que em 1,5 mM de Ca a concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ era menor em relação aos demais tratamentos, condição que pode ter influenciado em função da menor concentração de cloro presente no meio. Continha também maior quantidade de K em relação a 10 mM de K e menor concentração de NH_4NO_3 em relação a 60 mM de N. Acredita-se que esses fatores possam ter favorecido o crescimento das plantas de *N. minutum* em meio contendo 1,5 mM de Ca.

Os resultados encontrados neste estudo, juntamente, com os obtidos em trabalhos semelhantes (apresentados neste trabalho), demonstram a importância em ser formular meios específicos para cada espécie, pois as exigências nutricionais entre as plantas são bem distintas, mesmo quando as espécies pertencem à mesma família.

5. Cultivo em meio formulado a partir dos melhores resultados anteriores

Com os resultados obtidos para cada macronutriente foi possível elaborar dois meios de cultura visando à otimização do crescimento da bromélia *N. minutum*, denominados T1 e T2 (descritos na Tabela 6).

Constatou-se após 180 dias de experimento a sobrevivência de todas as plantas cultivadas *in vitro* nos diferentes meios de cultura e foi possível observar um crescimento diferenciado entre as plantas (Figura 51).

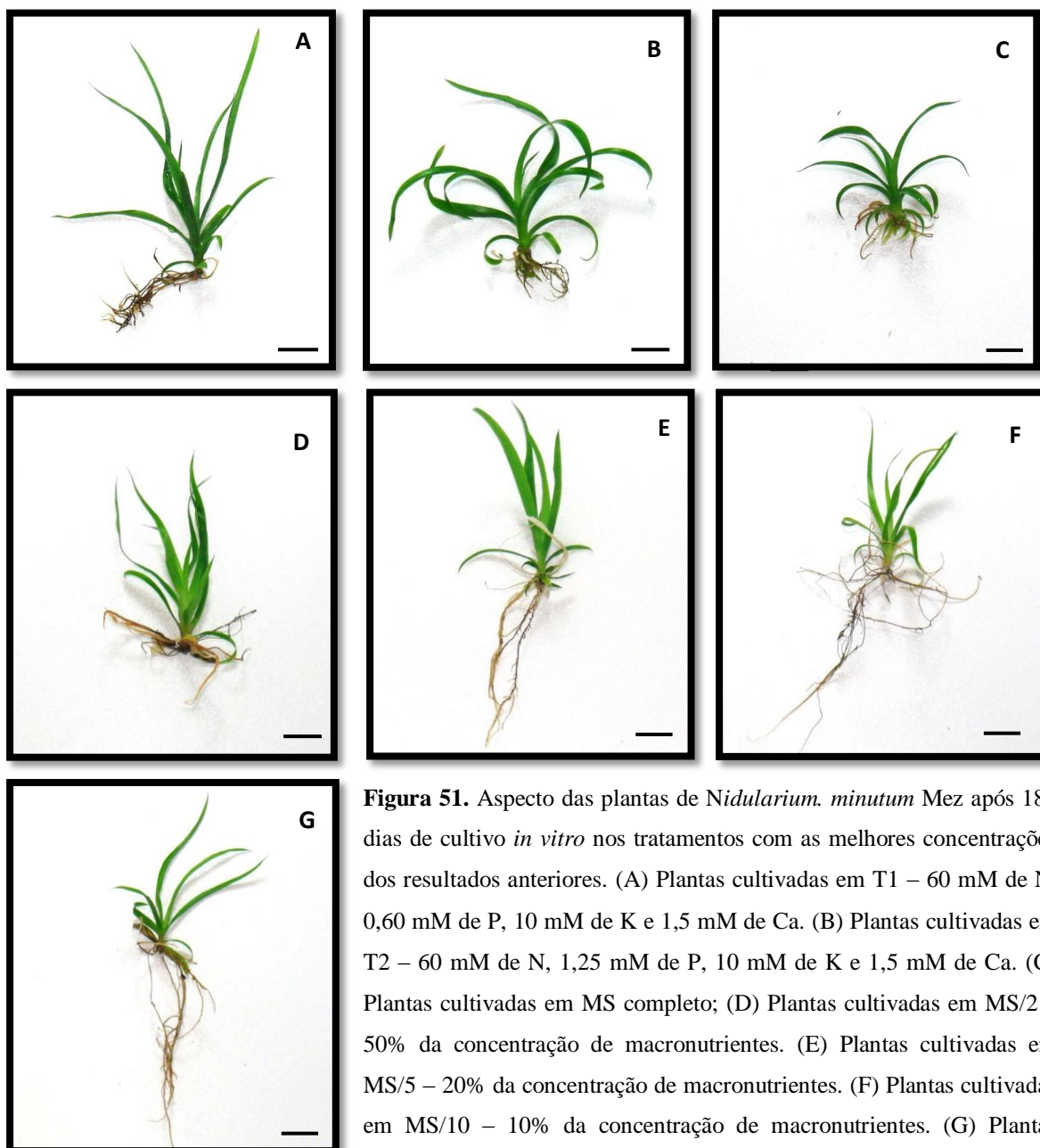


Figura 51. Aspecto das plantas de *Nidularium. minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos com as melhores concentrações dos resultados anteriores. (A) Plantas cultivadas em T1 – 60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca. (B) Plantas cultivadas em T2 – 60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca. (C) Plantas cultivadas em MS completo; (D) Plantas cultivadas em MS/2 – 50% da concentração de macronutrientes. (E) Plantas cultivadas em MS/5 – 20% da concentração de macronutrientes. (F) Plantas cultivadas em MS/10 – 10% da concentração de macronutrientes. (G) Plantas cultivadas em MS/20 – 5% da concentração de macronutrientes. As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Barra = 1 cm

Para os parâmetros relacionados à parte aérea, constatou-se que a quantidade de folhas por planta não sofreu alteração nos meios T1 e T2, apresentando um valor médio de 11 folhas por planta, resultado que se manteve para as plantas cultivadas no meio MS, MS/2 e MS/5 (Figura 52). Em relação ao comprimento foliar (Figura 53), as plantas cultivadas nos meios T1 e T2 apresentaram as folhas mais compridas com $8,4\pm 0,6$ e $8,7\pm 0,6$ cm, respectivamente.

As plantas que acumularam maior quantidade de massa fresca foram as mantidas nos tratamentos T1, T2 e MS (Figuras 54). Com os resultados do parâmetro massa seca constatou-se que o maior incremento celular ocorreu nas plantas mantidas nos tratamentos T1 e T2, demonstrando que as plantas crescidas em MS tiveram um maior acúmulo de água (Figura 55). Observando os resultados das massas, constatou-se que estes seguem a mesma tendência das plantas cultivadas nos tratamentos contendo as diferentes concentrações de N. Essa semelhança condiz com as informações de Van Der Werf (1996) sobre o crescimento ou redução das partes aérea e radicular em função da disponibilidade de nitrogênio.

Como neste experimento todos os macronutrientes foram alterados e os resultados apresentaram uma tendência semelhante aos obtidos nos tratamentos com N, concluímos que o N é requerido em maior quantidade pelas plantas da espécie *N. minutum*, assim como para a maioria das espécies vegetais.

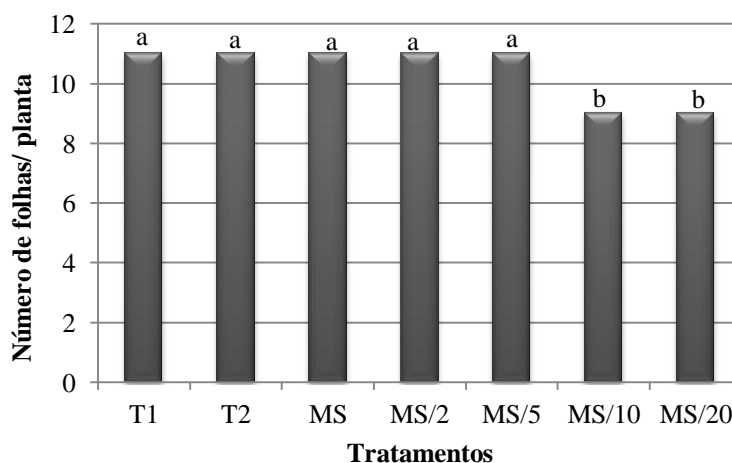


Figura 51. Número de folhas de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

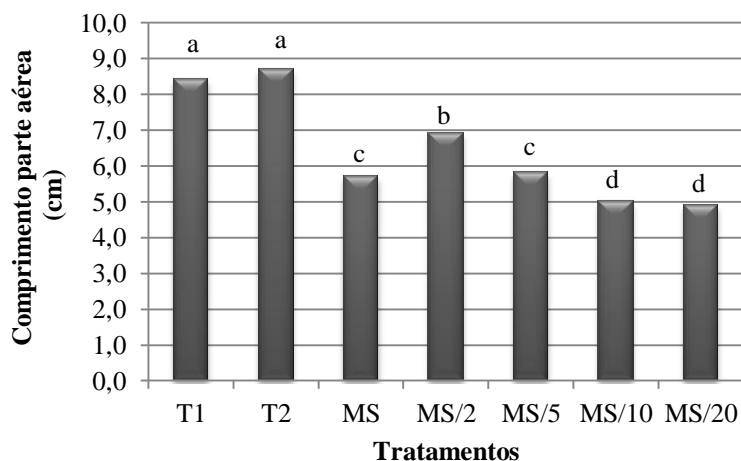


Figura 52. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

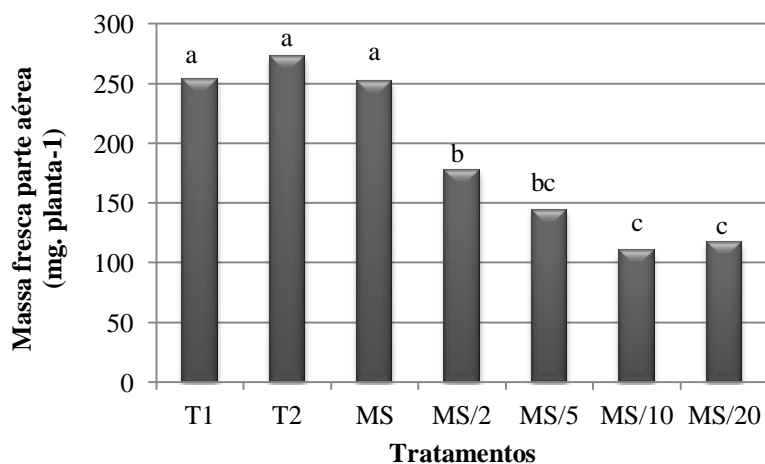


Figura 53. Quantidade de massa fresca da parte aérea (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

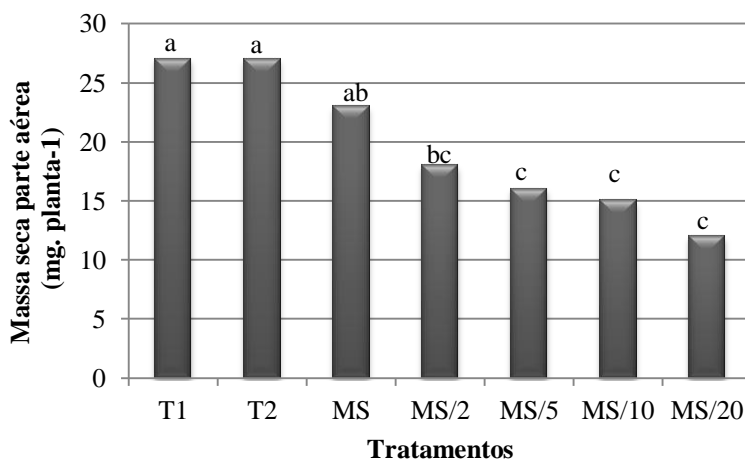


Figura 54. Quantidade de massa seca da parte aérea (mg) de plantas de *Nidularium minutum* Mez após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao sistema radicular a quantidade de raízes foi maior nas plantas crescidas em T1, não apresentando diferenças significativas nos demais tratamentos (Figura 55). Para análise de comprimento, verificou-se um aumento das raízes conforme a redução dos macronutrientes. As plantas que permaneceram nos meios MS/10 e MS/20 apresentaram raízes mais compridas com $7,7 \pm 0,8$ e $8,4 \pm 0,8$ cm, respectivamente (Figura 56). Sabe-se que o aumento no comprimento radicular é comum em plantas cultivadas sob pouca disponibilidade de nutrientes, mas ao compararmos esses resultados com os obtidos nos tratamentos contendo as diferentes concentrações de N, P, K e Ca, nota-se que os resultados seguiram a mesma tendência das plantas crescidas nas diferentes concentrações de N, ou seja, raízes maiores conforme a diminuição na concentração do nutriente no meio, seguindo a mesma tendência do comprimento da parte aérea. Dessa forma, sugere-se que em situação de deficiência o nutriente que mais influencia no comprimento radicular é o N.

A análise de massa fresca radicular seguiu a mesma tendência encontrada para o parâmetro comprimento radicular. As plantas mantidas nos tratamentos MS/10 e MS/20 apresentaram a maior quantidade de massa com 55 ± 17 mg e 65 ± 36 mg, respectivamente (Figura 57). De acordo com os resultados obtidos na análise de massa seca das raízes o incremento celular foi maior para as plantas mantidas em T1 e T2. Para os demais tratamentos não houve diferenças significativas (Tabela 58).

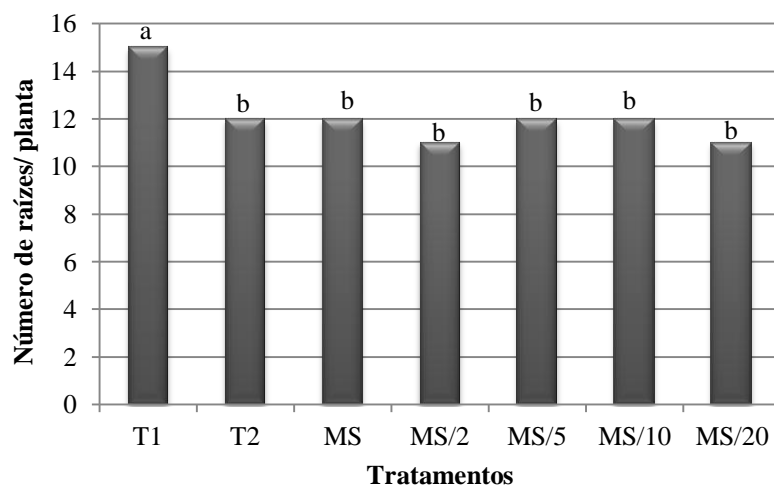


Figura 55. Quantidade de raízes de plantas da espécie *Nidularium minutum* após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

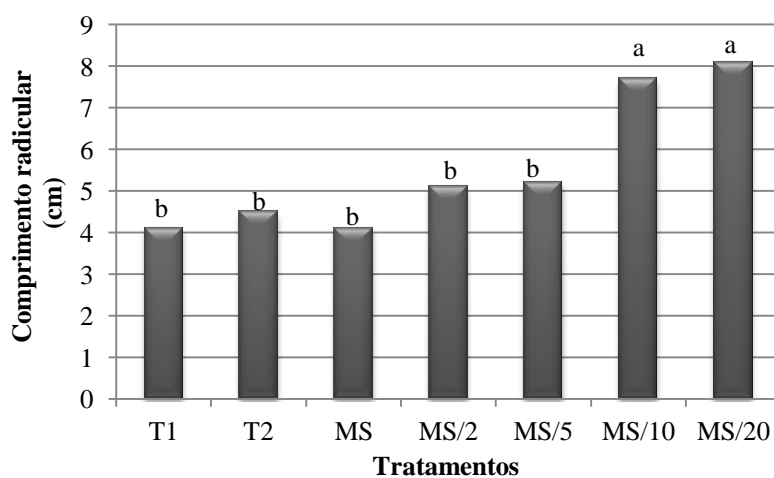


Figura 56. Comprimento radicular (cm) de plantas da espécie *Nidularium minutum* após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

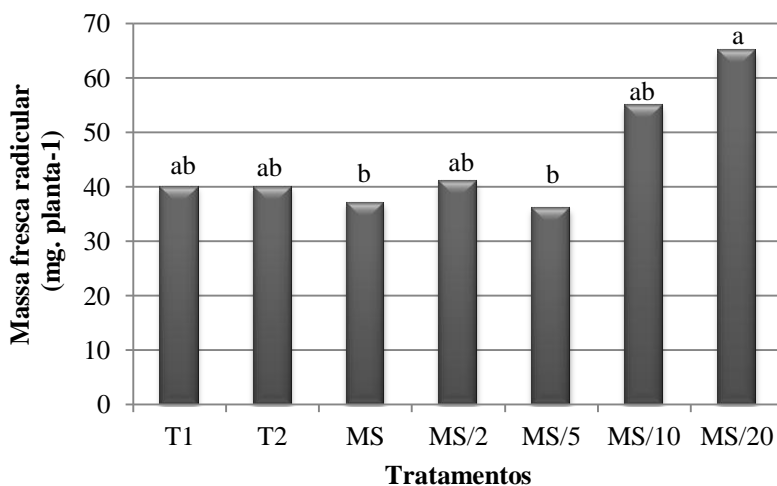


Figura 57. Quantidade de massa fresca radicular (mg) de plantas da espécie *Nidularium minutum* após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

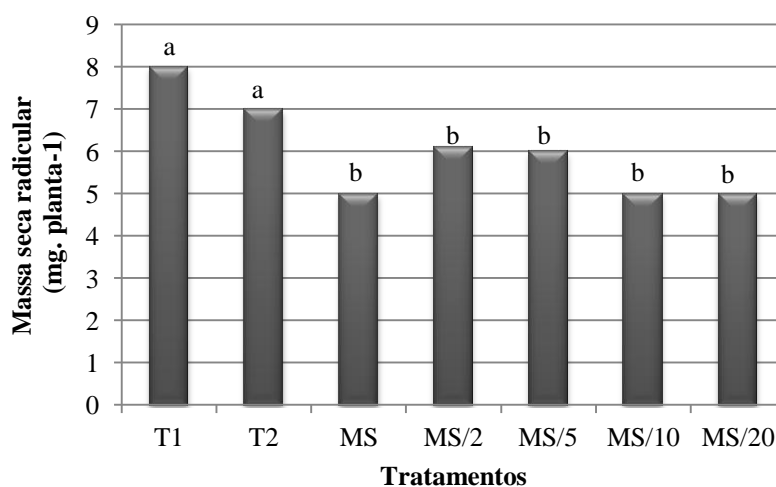


Figura 58. Quantidade de massa seca radicular (mg) de plantas da espécie *Nidularium minutum* após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os teores de clorofilas e carotenoides foram muito semelhantes entre os tratamentos T1, T2, MS e MS/2, no entanto, as maiores médias foram obtidas nas plantas mantidas em T2 com 1497 μg de clorofila a.g⁻¹MF, 511 μg de clorofila b.g⁻¹MF e 459 μg de carotenoides.g⁻¹MF e MS com 1431 μg de clorofila a.g⁻¹MF, 599 μg de clorofila b.g⁻¹MF e 436 μg de carotenoides.g⁻¹MF (Figura 59).

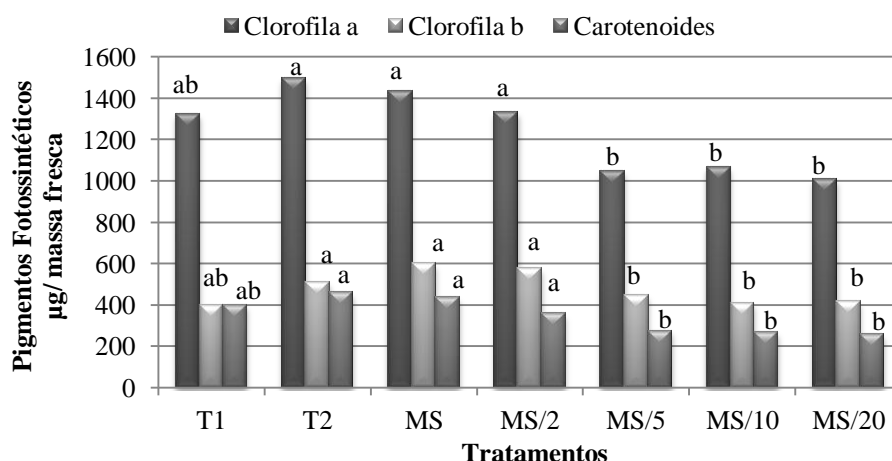


Figura 59. Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides) (μg / massa fresca) extraídos de plantas da espécie *Nidularium minutum* após 180 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos T1 (60 mM de N, 0,60 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), T2 (60 mM de N, 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca), MS completo, MS/2 (50% da concentração de macronutrientes), MS/5 (20% da concentração de macronutrientes), MS/10 (10% da concentração de macronutrientes) e MS/20 (5% da concentração de macronutrientes). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS original. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A redução no conteúdo de clorofilas e carotenoides das plantas mantidas nos tratamentos MS/5, MS/10 e MS/20, em relação aos demais tratamentos, provavelmente esta relacionado à redução na disponibilidade dos nutrientes, principalmente o N e K. O N por estar presente na formação da molécula de clorofila, quando em deficiência pode ocasionar redução no tamanho dos cloroplastos e baixo conteúdo de clorofila (Prado, 2008). A deficiência de K também pode comprometer o acúmulo de pigmentos, por ser um cátion ativador de muitas enzimas envolvidas na respiração e fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2013).

Utilizando a quantidade de clorofilas como indicador nutricional, pode-se concluir que os tratamentos não comprometeram o estado nutricional das plantas, mesmo nas diluições do

meio MS. Resultado que corrobora com o relato de Benzing (2000), indicando que *N. minutum* pode ser uma espécie adaptada a pouca disponibilidade de nutrientes.

Com os resultados obtidos, constatou-se que as plantas desta espécie são bem resistentes, pois mesmo as cultivadas com pouca disponibilidade de nutrientes, MS/10 e MS/20 sobreviveram por 180 dias de cultivo *in vitro*. De acordo com Benzing (2000), muitas bromélias estão adaptadas a pouca disponibilidade de nutrientes, pois em condições naturais, os baixos níveis de nutrientes disponíveis no solo é uma condição comum às plantas (Epstein & Bloom, 2006).

Tamaki *et al.* (2007) estudaram clones da bromélia *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar ‘Smooth Cayenne’ cultivados em diferentes diluições do meio de Murashige & Skoog (1962) (MS; MS/2; MS/5; MS/10; MS/60 e MS/100). Os autores constataram que plantas do abacaxizeiro podem ser cultivadas no meio MS/5, pois os resultados não apresentaram diferenças significativas em relação ao desenvolvimento das plantas cultivadas no meio MS completo. Resultados que diferem dos encontrados para as plantas de *N. minutum*, mas que confirmam a adaptação das bromélias a pouca disponibilidade de nutrientes.

Comparando-se os tratamentos, as plantas crescidas em T1 e T2 apresentaram-se muito semelhantes, com lotes bem homogêneos em relação à aparência das plantas. As plantas mantidas nestes tratamentos apresentaram poucas folhas senescentes e clorose.

Os demais parâmetros indicam que o crescimento das plantas foi satisfatório nos tratamentos contendo maior quantidade de sais, no entanto, após análises que consideraram os resultados obtidos e as características gerais das plantas, conclui-se que o meio mais adequado para o cultivo *in vitro* da bromélia terrícola *N. minutum* é o denominado T2.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final desta pesquisa conclui-se que os resultados obtidos foram satisfatórios, pois constatou-se que as plantas da espécie *Nidularium minutum* Mez são bem resistentes as diferentes concentrações dos macronutrientes N, P, K e Ca presentes no meio MS, pois as plantas cultivadas sob baixas concentrações e ausência dos macronutrientes sobreviveram durante os 180 dias de cultivo, comportamento, considerado, favorável aos estudos e à conservação da espécie.

Com as análises dos tecidos foliares de exemplares saudáveis de plantas conservadas *in situ*, de sementes e dos nutrientes do solo pôde-se ter um melhor conhecimento das exigências nutricionais de *N. minutum*.

Apesar de não ter sido encontrada uma concentração de máxima eficiência para os tratamentos N, P, K e Ca, foi possível encontrar tendências, tendo como base parâmetros de crescimento, como acúmulo de massa (importante para o processo de aclimatização) e condição nutricional com o acúmulo de pigmentos fotossintéticos, sendo possível a formulação de novos meios.

Os resultados mostraram a importância de se fazer ajustes na composição mineral do meio de cultura, pois as plantas cultivadas nos meios modificados cresceram mais do que as plantas cultivadas no meio MS. Sendo assim, pôde-se atingir o objetivo desta pesquisa otimizando o crescimento *in vitro* de plantas de *N. minutum*.

Com a finalização do cultivo *in vitro* a próxima etapa é acompanhar o comportamento dessas plantas no processo de aclimatização. Dessa forma, alguns indivíduos foram acondicionados em sementeira para o acompanhamento do crescimento *ex vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.V. & TAMAKI, V. 2012. Influence of NPK on the growth of bromeliad *Nidularium minutum* Mez cultivated *in vitro*. Communications in Plant Sciences (2237-4027) v. 2, issues 3-4, p. 137-139.
- 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(1):106–112.
- ARAÚJO, A.G. 2004. Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras. p. 77.
- ARAÚJO, V.A.; MELO, S.K.; ARAÚJO, A.P.A.; GOMES, M.L.M.; CARNEIRO, M.A.A. 2007. Relationship between invertebrate fauna and bromeliad size. Brazilian Journal of Biology. São Carlos, vol.67, n.4.
- ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; ALMENDAGNA, F. R.; CARVALHO, J.G.; ZARRAGA, D.Z.A. 2009. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39.
- ASHRAFI, E.N.; VAHDATI, K.; EBRAHIMZADEH, H.; MIRMASOUMI, M. 2010. Analysis of *in vitro* explants mineral contents to modify medium mineral composition for enhancing growth of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.8 (2): 325-329.
- BELLOTE, A.F.J.; SILVA, H.D. 2000. Técnicas de amostragem e avaliações nutricionais em plantios de *Eucalyptus* spp. IN: GONÇALVES, J.L. de M. et al.(eds). Nutrição e fertilização florestal. Piracicaba: IPEF, p. 105-133.
- BENZING, D.H. 2000. Bromeliaceae: profile of na adptative radiation. UK: Cambridge University Press. p.690.
- BLEVINS, D.G. 1999. Por que as plantas precisam de fósforo? Potafos - Informações agrônômicas n° 87, p. 4-5.
- BUNN, E.; TURNER, S.R.; DIXON, K.W. 2011. Biotechnology for saving rare and threatened florain a biodiversity hotspot. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 47:188-200
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1990. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.(Eds.). Técnicas e aplicações de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa - CNPH, p. 40-65.

- CALHEIROS, A.S.; OLIVEIRA, M.W.; FERREIRA, V.M.; BARBOSA, G.V.S.; SANTIAGO, A.D.; ARISTIDES, E.V.S. 2012. Produção de biomassa, açúcar e de proteínas em função de variedades de cana e de adubação fosfatada. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, n. 2, p. 809-818.
- CAMBUÍ, C.A. 2009. Absorção e assimilação de ureia pela bromélia epífita com tanque *Vriesea gigantea*. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. p. 146.
- CASARINI E. 2004. Doses de N e K aplicados via fertirrigação na cultura da roseira (*Rosa sp.*) em ambiente protegido. Piracicaba: USP-ESALQ. p. 120 (Tese doutorado).
- CID, L.P.B. 2010. Cultivo *in vitro* de plantas. Embrapa informações tecnológicas. Brasília, DF, p. 303.
- COELHO, L.C.; KAWAMOTO, L.S.; RODAS, C.L.; SOUZA, G.A.; PINHO, P.J.; CARVALHO, J.G. 2011. Caracterização de sintomas visuais, parâmetros de crescimento e desenvolvimento de *Tagetes erecta* sob deficiências nutricionais. *Revista Agrarian. Dourados*, v.4, n.12, p. 113-122.
- COSTA, M.A.P.C.; MOREIRA, M.J.S.; SOUZA, F.V.D.; ROCHA, M.A.C. 2012. Conservação *in vitro* de *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker e *Aechmea miniata* Beer ex Baker (Bromeliaceae - Bromelioideae). *Magistra, Cruz das Almas - BA*, v. 24, n. 4, p. 293-303.
- DINIZ, J.D.N.; GONÇALVES, A.N.; HERNANDEZ, F.F.F.; TORRES, A.C. 1999. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.34, n.7, p. 1201-1209.
- DURAN, S. & MONTEIRO, K. 2001. Jardim de luxo sustenta tráfico de plantas. Disponível em: <http://www.biodiversityreporting.org/article.sub?c=Brasil&cRef=Brazil&docId=232&year=2001>. (acesso em 30/01/2011).
- EPSTEIN, E. & BLOOM, A.J. 2006. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Ed. Planta, Londrina, p. 58-64.
- FERNANDES, A.R.; PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G.; MIRANDA, J.R.P. 2007. Crescimento e absorção de nutrientes por mudas de Freijó (*Cordia goeldiana* HUBER) em função de doses de fósforo e de zinco. *R. Árvore, Viçosa-MG*, v.31, n.4, p. 599-608.
- FERREIRA, A.G. & BORGHETTI, F. 2004. Germinação: do básico ao aplicado. Editora Artmed, Porto Alegre, p. 316.
- FIGUEIREDO, M.A.; PASCOAL, M.; ARAUJO, A.G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RODRIGUES, V.A. 2008. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. *Ciencia Rural, Santa Maria*, v. 38, n.1, p. 255-257.
- GIVINISH T.J.; BARFUSS, M.H.J.; BENJAMIN VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P.A.; JABAILY, R.S. CRAYN, D.M.; SMITH, J.A.C.; WINTER,

- K.; BROWN, G.K.; EVANS, T.M.; HOLST, B.K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K.J. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98(5): 000–000.
- GRANT, C.A.; FLATEN, D.N.; TOMASIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. 2001. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Potafos – Informações agronômicas*. n° 95, p. 1-5.
- GRIBBLE, K.; CONROY, J.P.; HOLDFORD, 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 (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 116.
- GUERRERO A.C; FERNANDES D.M; LUDWIG F. 2012. Acúmulo de nutrientes em gébera de vaso em função de fontes e doses de potássio. *Horticultura Brasileira* 30: 201-208.
- 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.
- KANASHIRO, S. 2005. Nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. p.187.
- KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R.C.S.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; JOCYS, T. 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. *Hoehnea* 34(1). p. 59-66.
- KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R.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.
- KURITA, F.M.K. 2011. Crescimento *in vitro* da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio. Dissertação (Mestrado em biodiversidade vegetal e meio ambiente). Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente.
- KURITA, F.M.K.; SILVA, P.P.A.; TAMAKI, V. 2011. Crescimento *in vitro* de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de cálcio. X Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço – MG.

- KURITA, F.M.K.; SILVA, P.P.A.; ANDRADE, S.V.; TAMAKI, V. 2012. Photosynthetic pigments of three species of bromeliads cultured *in vitro* with different concentrations of nitrogen. *Communications in Plant Sciences (2237-4027)* v. 2, issues 3-4, p. 63-65.
- LARCHER, V. 2004. *Ecofisiologia Vegetal*. Ed. Rima, São Carlos.
- LEME, E.M.C. & MARIGO, L.C. 1993. *Bromélias na natureza*. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual. p. 183.
- LEME, E.M.C. 1997. *Canistrum: Bromélias da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro, Salamandra, p. 107.
- LEME, E.M.C. 2000. *Nidularium Bromélias da Mata Atlântica* – Ed. Sextante Artes, Rio de Janeiro.
- 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.
- LUTHER, H.E. 2010. An alphabetical list of bromeliad binomials. 12th ed. Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens.
- MALAVOLTA, E. 2006. *Manual de nutrição mineral de plantas*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. p. 638.
- MAMEDE, M.C.H.; SOUZA, V.C.; PRADO, J.; BARROS, F.; WANDERLEY, M.G.L.; RANDO, J.G. *Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas de Extinção no Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica. 2007. p. 165.
- MARSCHNER, H. 1986. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press.
- MENDES, A.D.R.; OLIVEIRA, L.E.M.; NASCIMENTO, M.N.; REIS, K.L.; BONOME, L.T.S. 2012. Concentração e redistribuição de nutrientes minerais nos diferentes estádios foliares de seringueira. *Acta Amazonica* vol. 42(4) p. 525-532.
- MERCIER, H. 2004. *Estudos em Bromeliaceae: desenvolvimento e metabolismo do nitrogênio*. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 48.
- MERCIER, H. & NIEVOLA, C.C. 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1 (1): 57-62.
- MOREIRA, B.A.; BARROS, M.A.V.C.; WANDERLEY, M.G.L. 2005. Morfologia polínica de algumas espécies dos gêneros *Neoregelia* l.b. sm. e *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo. Brasil, *Acta Botanica Brasílica*, p. 61-70.

- MOREIRA, B.A.; WANDERLEY, M.G.L.; BARROS, M.A.V.C. 2006. Bromélias: Importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia. Curso de capacitação de monitores. Instituto de Botânica, São Paulo. p. 12.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NAS, M.N. & READ, P.E. 2004. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and *in vitro* micropropagation of hazelnut. *Sci. Hortic.* 101: 189- 200.
- NAVES, V.C. 2001. Propagação *in vitro* da bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. p. 64.
- NEGRELLE, R.R.B.; ANACLETO, A.; MITCHELL, D. 2011. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. *Acta Scientiarum Biological Sciences, Maringa*, v. 34, n. 1, p. 91-100.
- NIEDZ R.P. & EVANS T.J. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In vitro cellular developmental Biology-Plant* 43:370-381.
- 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. p. 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). p. 1255-1264.
- PAULA, M.B., MESQUITA, H.A., NOGUEIRA, F.D. 1998. Nutrição de adubação do abacaxizeiro. *Informe agropecuário* 19 (195): 33-39
- PEREIRA, C.; CUQUEL, F.L.; PANOBIANCO, M. 2010. Germinação e armazenamento de sementes de *Nidularium innocentii* (Lem.). *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 32, nº 2, p. 36-41.
- PILATTI, F.K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E.E.; VIANA, A.M. 2011. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 47:82–98
- PRADO, R.M. 2008. *Nutrição de plantas*. São Paulo – Ed. Unesp, p. 407.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2007. *Biologia vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- REED, B.M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V.C. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 47:1–4

- RONQUIN, C.C. 2010. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite. p. 26.
- RUSSOWSKI, D. & NICOLOSO, 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.
- SANTOS, J.M.; PEGORARO, R.F.; PEREIRA, P.R.G.; FAGUNDES, J.L.; MISTURA, C.; AGOSTINI, M.A.V.; MARTINEZ, H.E.P.; FONTES, P.C.R. 2005. Comportamento da cebolinha cultivada sob diferentes níveis de cloreto de potássio em solução nutritiva. Revista Ceres, 52(303):729-738.
- SANTOS, F.C.; JUNQUEIRA, K.P.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; FIGUEIREDO, M.A.; RODRIGUES, V.A. 2008. Influência de fontes de potássio na multiplicação *in vitro* de crisântemo. Revista Ceres, 55(6): 532-536.
- SCHUMACHER, M.V.; CECONI, D.E.; SANTANA, C.A. 2003. Influência de diferentes doses de fósforo no crescimento de plantas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. Bol. Pesq. Fl., Colombo, n. 47, p. 99-114.
- SELAMAT, M.M. & RAMLAH, M. 1993. The response of pineapple cv. Gandul to nitrogen, phosphorus and potassium on peat soil in Malasia. Acta Horticulturae, n. 334, p. 247-254.
- SHAN, A.Y.K.V.; OLIVEIRA, L.E.M.; BONOME, L.T.S.; MESQUITA, A.C. 2012. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.47, n.6, p.754-762.
- 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. Brasília. v. 45, n.9, p. 965-972.
- SILVA, S.A.; MORAES, W.B.; SOUZA, G.S. 2011. Doses de cálcio no crescimento do feijoeiro cultivado em solução nutritiva, na presença de alumínio. IDESIA (Chile) v. 29, n. 3, p. 53-58.
- SILVA, P.P.A.; KURITA, F.M.K.; TAMAKI, V. 2012. Growth of bromeliad *Ananas ananassoides* in different concentrations of nitrogen. Communications in Plant Sciences (2237-4027) v. 2, issues 3-4, p.109-11.
- STAHL, J.; ERNANI, P.R.; GATIBONI, L.C.; CHAVES, D.M.; NEVES, C.U. 2013. Produção de massa seca e eficiência nutricional de clones de *Eucalyptus Dunnii* e *Eucalyptus Benthamii* em Função da adição de doses de fósforo ao solo. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 287-295.

- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2013. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre: Artmed, p. 918.
- TAKANE, R.J.; MINAMI, K.; LUCCHESI, A.A.; ALMEIDA, M. 1994. Influência do cloreto de cálcio no crescimento de explantes de *Gypsophila paniculata* L. (caryophyllaceae), CULTIVADOS *in vitro*. Scientia agrícola, Piracicaba, 51(2):235-239.
- TAMAKI, V. 2003. Metabolismo nitrogenado e sinalização entre raiz e parte aérea em plantas de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 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.
- TAMAKI, V.; DE PAULA, S. M.; NIEVOLA, C. C.; KANASHIRO, SHOEY. 2011. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. O Mundo da Saúde, São Paulo; 35(1): p. 91-97.
- VAN DER WERF, A. Growth analysis and photoassimilate partitioning. 1996. In. E. Zmski and A. A. Schaffer. Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. New York, p. 1-20.
- WANDERLEY, M.G.L & TAVARES, A.R., 2011. Guia de Identificação de Bromélias da Reserva de Paranapiacaba. Instituto de Botânica. São Paulo, p. 110.
- WINKLER, U. & ZOTZ, G. 2009. Highly efficient uptake of phosphorus in epiphytic bromeliads. Annals of Botany 103: 477-484.
- WHITE, P.J. & BROWN, P.H. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. Annals of Botany 105. p. 1073–1080.

RESUMO

As bromélias são de grande importância ecológica e possuem um alto valor comercial. Devido às inflorescências vistosas e por serem de fácil adaptação, são muito utilizadas no paisagismo. O interesse comercial associado ao desmatamento coloca algumas espécies em risco de extinção, como é o caso da bromélia ornamental de hábito terrícola *Nidularium minutum* Mez, planta endêmica da Mata Atlântica localizada na região de Paranapiacaba/ SP. Uma forma de se preservar é com o uso do cultivo *in vitro*, ferramenta que possibilita o crescimento de grande quantidade de plantas em um curto período de tempo, além de favorecer os estudos nutricionais. O presente trabalho teve como objetivo estudar o crescimento de plantas de *N. minutum* cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, visando à elaboração de um meio ideal para o crescimento desta planta. Neste estudo, plântulas germinadas em meio de cultura contendo água, sacarose e ágar, foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio Murashige & Skoog (MS) modificado com diferentes concentrações de nitrogênio (0, 3,75, 7,50, 15,00, 30,00, 60,00, 120,00 e 175,00 mM), fósforo (0, 0,30, 0,60, 1,25, 2,50, 5,00 e 10,00 mM), potássio (0, 1,88, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 e 40,00 mM) ou cálcio (0, 0,75, 1,50, 3,00, 4,50 e 6,00). As concentrações de micronutrientes, tiamina, mioinositol e sacarose permaneceram as mesmas do MS completo. As plantas permaneceram em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e a temperatura de 26 ± 2 °C durante 180 dias. Os parâmetros analisados foram número de folhas, comprimentos dos eixos caulinares e radiculares, teores de massas fresca e seca das partes aérea e radicular, além da quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides). Os resultados foram favoráveis ao crescimento das plantas nos tratamentos contendo 60 mM de N, 0,60 e 1,25 mM de P, 10 mM de K e 1,5 mM de Ca e a partir desses resultados foi possível elaborar dois meios de cultura denominados T1 e T2. O crescimento das plantas mantidas nestes tratamentos foi comparado ao meio MS completo e algumas diluições dos macronutrientes (1/2, 1/5, 1/10 e 1/20). Os resultados mostraram que as alterações no meio MS favorecem o crescimento das plantas de *N. minutum*.

Palavras-chave: Bromeliaceae, propagação *in vitro*, nutrição mineral, conservação

ABSTRACT

Bromeliads play a very important ecological role and they also have a high value as commercial products. They are often used in landscaping due to their showy inflorescences as well as their ability to adapt. Some species are at risk of becoming endangered because of commercial interests associated with deforestation, namely: the ornamental bromeliad terrestrial *Nidularium minutum* Mez, which is endemic to the Atlantic forest in the Paranapiacaba/SP range. One way to preserve this species is using *in vitro* culture, a tool which allows the growth of many plants in a short period of time. Furthermore, it also promotes nutritional studies. The present work was aimed at studying the growth of plants *N. minutum in vitro* at different concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium in order to develop an ideal medium for the growth of this plant. In this study, seedlings germinated in culture medium containing water, sucrose and agar, then they were transferred to 250 mL flasks containing 40 mL of Murashige and Skoog (1962) (MS) medium modified with different concentrations of nitrogen (N) (0, 3.75, 7, 50, 15.00, 30.00, 60.00, 120.00 and 175.00 mM), phosphorus (P) (0, 0.30, 0.60, 1.25, 2.50, 5.00 and 10.00 mM), potassium (K) (0, 1.88, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00 and 40.00 mM) or calcium (Ca) (0, 0.75, 1.50, 3.00, 4.50 and 6.00). The micronutrients concentrations, thiamine, myo-inositol and sucrose remained the same as the complete MS. The plants were maintained in culture room with 12h photoperiod, photosynthetic active radiation of $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and temperature of $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 180 days. The following parameters were evaluated: number of leaves, shoot and root length, fresh and dry weight of the aerial part and root as well as the amount of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b and carotenoids). The results were favorable for plant growth in the treatments containing 60 mM N, 0.60 and 1.25 mM P, 10 mM K and 1.5 mM Ca. Based upon these results, it was possible to create two culture medium called T1 and T2. The growth of plants maintained under these treatments was compared to complete MS medium and some of the macronutrients dilutions (1/2, 1/5, 1/10 and 1/20). The results showed that alterations in MS medium favored the *N. minutum* plant growth.

Keywords: Bromeliaceae, *in vitro* propagation, mineral nutrition, conservation