**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação morfofisiológica, histológica e histoquímica das vias
morfogênicas na micropropagação de *Neoregelia* sp**

Eveline Calderan Meneghetti

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas

**Piracicaba
2015**

Eveline Calderan Meneghetti
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Avaliação morfofisiológica, histológica e histoquímica das vias morfogênicas na
micropropagação de *Neoregelia* sp**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Meneghetti, Eveline Calderan

Avaliação morfofisiológica, histológica e histoquímica das vias morfogênicas na micropropagação de *Neoregelia* sp / Eveline Calderan Meneghetti . - - Piracicaba, 2015.
80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Bromeliaceae* 2. Nitrogênio 3. Organogênese Adventícia 4. Embriogênese 5.
Somática 6. Totipotência 7. Pluripotência I. Título

CDD 584.22
M541a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus avós Amélia e Paulo (*in memoriam*),
por me mostrarem o verdadeiro valor
e sentido da vida,
Ofereço.

Aos meus pais Angela e Evaldo, à minha
irmã Karine e ao meu esposo Guilherme,
por me apoiarem e acreditarem em mim,
Dedico.

*“Desfrute as pequenas coisas,
porque talvez um dia você olhe para trás
e se dê conta de que eram as grandes coisas”.*

Robert Brault

AGRADECIMENTOS

À Deus, que em seu amor e pela intercessão de Maria, me deu sabedoria e forças para concluir este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcilio de Almeida, meu orientador, pela oportunidade, pela paciência, pelas correções, pelo exemplo e pelos conhecimentos transmitidos.

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, pela amizade, pelos conselhos e por me mostrar que a vida é mais bonita e mais leve.

Ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas: Aline, Natalia, Renato, Gabi, Rafinha, Renan, Matheus e Gillyade. E também à antiga formação do laboratório: Kath, Erika, Fabi, Leandro, Germana, Lívia, Chico, Marília e Raquel sem vocês seria impossível este trabalho ter sido realizado, obrigada por toda ajuda, pelas conversas e risadas!

Aos professores e amigos do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas (ESALQ/USP), pelos conhecimentos compartilhados. Obrigada por me ajudarem a crescer e amadurecer como pesquisadora e também como pessoa!

À querida Solizete, secretária do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela paciência, prontidão e alegria com que sempre me atendeu.

À todos do Departamento de Ciência Biológicas (ESALQ/USP) que me incentivaram durante esta jornada.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia das Árvores (LCF ESALQ/USP), de modo especial ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves e ao técnico José Roberto Romanini (Beto), pela disponibilização do espaço físico e pela ajuda rotineira durante os experimentos.

Ao Prof. Dr. Quirino A. C. Carmello e ao Laboratório de Tecidos Vegetais (LSO ESALQ/USP), pela ajuda com as análises de nitrogênio total e fracionado.

Ao Leandro S. de Oliveira e Fernando A. Piotto, pela ajuda durante as análises estatísticas.

Aos amigos da graduação, Turma IV de Ciências Biológicas (2005-2009 ESALQ/USP), de modo especial: Cigana (Aline S.), Relva (Juliana), Cui-k (Aline B.), ½ a ½ (Mariana), Keini e Gasper (Thais), obrigada por todos estes anos de amizade, pelo respeito, pelas infinitas conversas no Whatsapp e por serem insubstituíveis, amo vocês!

Aos amigos que fiz durante minha vida e que trago sempre em meu coração, com certeza cada um contribuiu para eu chegasse até aqui, de modo especial minha gratidão à: Larissa (Spuleta), pelas conversas nerds sobre livros, filmes e séries; e também às queridas

Patrícia, Caroca e Lilian, pela amizade de longos anos, pelas partilhas e por serem inesquecíveis.

Ao querido Padre Kleber, por todos os conselhos, pelo apoio e por estar sempre presente, mesmo no momento, estando em outro continente.

À minha família, especialmente aos meus pais, por todo carinho e apoio. De modo particular ao Caio pelas correções na tradução do resumo para o inglês.

Ao meu esposo Guilherme, pelo companheirismo, pelo seu amor incondicional, por ser meu ponto de equilíbrio e por tornar minha vida mais feliz, amo você!

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!!!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Bromeliaceae	25
3.2 Cultura de tecidos	26
3.3 Morfogênese	27
3.4 Meios de cultura	29
3.5 Metabolismo do nitrogênio.....	31
3.6 Nitrogênio no meio de cultura	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Localização da área experimental.....	35
4.2 Material vegetal	35
4.2.1 Estabelecimento do micro jardim clonal	35
4.3 Condições de cultivo	36
4.4 Multiplicação a partir de brotações de microcepas	36
4.4.1 Avaliações morfofisiológicas das brotações de microcepas.....	38
4.4.2 Avaliação do nitrogênio total e nitrogênio fracionado	38
4.4.3 Aclimatização das brotações de microcepas	38
4.5 Multiplicação a partir de explantes foliares.....	39
4.5.1 Avaliações morfofisiológicas dos explantes foliares	40
4.5.2 Procedimentos estatísticos.....	40
4.6 Monitoramento das vias morfogênicas em explantes foliares.....	40
4.6.1 Avaliações morfofisiológicas das vias morfogênicas em explantes foliares.....	40
4.6.2 Análise histológica e histoquímica dos explantes foliares	41
4.6.3 Procedimentos estatísticos.....	41

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Multiplicação a partir de brotações de microcepas	43
5.1.1 Avaliações morfofisiológicas	43
5.1.2 Análise do nitrogênio total e fracionado	48
5.1.3 Aclimatização das brotações das microcepas	53
5.2 Multiplicação a partir de explantes foliares	54
5.2.1 Análises morfofisiológicas	54
5.3 Monitoramento das vias morfogênicas em explantes foliares	57
5.3.1 Análise morfofisiológica	57
5.3.2 Análises histológicas e histoquímicas	59
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71

RESUMO

Avaliação morfofisiológica, histológica e histoquímica das vias morfogênicas na micropropagação de *Neoregelia* sp

A família Bromeliaceae apresenta importância ecológica e econômica, desta forma, o desenvolvimento de protocolos para a micropropagação de espécies dessa família, faz-se necessário, a fim de suprir sua demanda comercial e mesmo ecológica. A escolha do meio de cultura e do explante utilizado durante a micropropagação são fundamentais para um protocolo eficaz. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar as diferenças quantitativas e qualitativas no desenvolvimento de explantes de *Neoregelia* sp em meios de cultura e monitorar as vias morfogênicas dos propágulos obtidos em explantes foliares. Para tanto, brotos de microcepas e explantes foliares procedentes de um micro jardim clonal, foram transferidos para os meios de cultura de multiplicação MS, ½ MS e WPM, todos suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP, onde foram mantidos por 120 dias e submetidos a diversas análises morfofisiológicas. Paralelamente, explantes foliares foram mantidos em meio de cultura MS de multiplicação para o monitoramento das vias morfogênicas durante os processos regenerativos. Para os experimentos com brotos de microcepas verificou-se que o meio de cultura MS proporcionou a melhor taxa de multiplicação, maior crescimento dos brotos, obtendo os valores mais elevados de peso de matéria fresca e seca, além disso, apresentaram maior acúmulo de nitrogênio total e proteico. No entanto, os meios de cultura ½ MS e WPM promoveram uma taxa de multiplicação semelhante a do MS, mas com brotos menores e menos vigorosos, porém, mais homogêneos, com isso, na dependência do objetivo do cultivo *in vitro*, não deve ser desconsiderada a possibilidade de utilização dos meios de cultura ½ MS e WPM. Os explantes foliares não se desenvolveram bem no meio de cultura WPM, não havendo diferença entre os meios MS e ½ MS, visto que ambos apresentaram resultados satisfatórios. As análises histológicas e histoquímicas identificaram células parenquimáticas, que atuam como células-tronco, manifestando capacidade morfogênica para toti ou pluripotência, dando origem respectivamente a embriões somáticos e gemas adventícias, em resposta aos estímulos *in vitro*.

Palavras-chave: Bromeliaceae; Nitrogênio; Organogênese Adventícia; Embriogênese Somática; Totipotência; Pluripotência

ABSTRACT

Morphophysiological, histological and histochemical morphogenic pathways in *Neoregelia* sp micropropagation

The Bromeliaceae family has an ecological and economic importance, therefore, the protocols development for micropropagation of species of this family becomes necessary in order to meet its business and even its ecological demand. The choice of culture medium and the explant used during micropropagation are essential for an effective protocol. Thus, the aim of this study was to evaluate the quantitative and qualitative differences in the explants development of *Neoregelia* sp in the culture media and monitor the morphogenetic pathways of obtained propagules from leaf explants. Consequently, shoots and leaf explants coming from microcloning garden were transferred to the MS, ½ MS and WPM multiplication culture media, all supplemented with 0.050 mg.L⁻¹ NAA and 0.50 mg.L⁻¹ BAP, where they were held for 120 days and submitted to morphological and physiological analysis. Therefore, leaf explants were kept on MS-medium multiplication for monitoring morphogenetic pathways during the regenerative processes. Furthermore, MS medium showed the best multiplication rate for the sprouts of the microstumps, increased growth of shoots, obtaining the highest values of fresh and dry matter weight, and also showed higher accumulation of total nitrogen and protein. However, the ½ MS and WPM culture media promoted a similar multiplication rate to the MS medium, with the development of the smaller and less vigorous shoots, but with greater homogeneity. This way, depending on the purpose of in vitro culture, their use in the micropropagation for this species should not be disregarded. The leaf explants are not well developed in WPM medium, and don't had significant difference between the MS and ½ MS culture medium, as both showed satisfactory results. The histological and histochemical analysis identified the presence of the parenchymatic cells, which act as stem cells, expressing morphogenic ability for toti or pluripotency, leading respectively to somatic embryogenesis or adventitious organogenesis in response to in vitro stimuli.

Keywords: Bromeliaceae; Nitrogen; Adventitious organogenesis; Somatic embryogenesis; Totipotency; Pluripotency

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática da sequência metodológica utilizada para o estabelecimento dos experimentos36
- Figura 2 - Valores médios do número de brotações (NB) de *Neoregelia* sp ao longo de 4 subcultivos sucessivos (30 dias cada) em função dos meios de cultura de multiplicação MS (A), ½ MS (B) e WPM (C) suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ de ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP44
- Figura 3 - Desenvolvimento de brotações nas microcepas de *Neoregelia* sp nos meios de cultura de multiplicação MS, ½ MS e WPM, suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ de ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP com 4 subcultivos sucessivos (30 dias cada)46
- Figura 4 - Valores médios do peso da matéria fresca e da matéria seca de brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre a 5% de probabilidade pelo teste Tukey47
- Figura 5 - Valores médios para os teores de nitrogênio total em brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.....49
- Figura 6 - Valores médios para os teores de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺) em brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey50
- Figura 7 - Valores médios para os teores de nitrogênio nítrico (N-NO₃⁻) nas brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos com 30 dias de duração cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey51
- Figura 8 - Valores médios para os teores de nitrogênio protéico nas brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM). Médias seguidas de

- mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey 52
- Figura 9 - Microplanta utilizada para aclimatização (A). Bandeja de tubetes com as microplantas durante o processo de aclimatização (B) 53
- Figura 10 - Desenvolvimento de propágulos em explantes foliares de *Neoregelia* sp nos meios de cultura de multiplicação MS, ½ MS e WPM, suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ de ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP com 4 subcultivos sucessivos (30 dias cada)..... 55
- Figura 11 - Valores médios do número de brotações (NB) a partir de explantes foliares de *Neoregelia* sp ao longo de 4 subcultivos sucessivos (30 dias) em função dos meios de cultura de multiplicação MS (A), ½ MS (B) suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ de ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP 55
- Figura 12 - Explantes foliares de *Neoregelia* sp mantidos em meio de cultura MS multiplicação. A - Protuberância da região proximal; B - Protuberância e presença de raiz; C - Protuberância e primórdio foliar e D - Protuberância, primórdio foliar e raiz. P = protuberância; R = raiz; PF = primórdio foliar.... 58
- Figura 13 - Número de explantes foliares de *Neoregelia* sp com desenvolvimento de protuberância e raiz em 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS de multiplicação. A – Número total de explantes foliares responsivos; B – Número de explantes foliares F1 responsivos; C – Número de explantes foliares F2 responsivos 58
- Figura 14 - Fotomicrografia de secções longitudinais de explantes foliares de *Neoregelia* sp. A – Região proximal do explante foliar recém-isolado da microplanta, evidenciando a região da injúria, a ausência de células em atividade meristemática e a presença de amiloplastos. B – Região proximal do explante foliar evidenciando o início da formação da protuberância com o desenvolvimento de meristemóides isolados por mucilagem (polissacarídeos) e a presença de compostos fenólicos. C – Região proximal do explante foliar com a presença de meristemóides isolados por mucilagem (polissacarídeos). D – Células parenquimáticas competentes à embriogênese somática observadas na região proximal do explante foliar. Am = Amiloplastos; Nc = Núcleo; N = Nucléolo; V = Vacúolo; setas pretas = região da injúria; setas amarelas = meristemóides; setas vermelhas = mucilagem (polissacarídeos); setas laranjas = compostos fenólicos; setas verdes = células parenquimáticas competentes à embriogênese somática

isoladas por mucilagem (polissacarídeos). Figuras A, B e C: Barras = 100 μm ;
 Figura D: Barra = 20 μm 60

Figura 15 - Fotomicrografia de secções longitudinais de explantes foliares de *Neoregelia* sp.

A – Região distal do explante foliar com muitos amiloplastos e células em processo de morte celular. B – Região mediana do explante foliar apresentando elevado consumo de amido. Am = Amiloplastos; setas pretas = células em processo de morte celular; setas amarelas = células em divisão celular. Barras = 100 μm 62

Figura 16 - Fotomicrografias de secções paradérmicas da região proximal de explantes foliares de *Neoregelia* sp.

A – Explante foliar original e região da protuberância evidenciando o desenvolvimento de gemas adventícias; B – Detalhe das gemas adventícias observadas em A; C e D – Pró-embriões, isolados por mucilagem (polissacarídeos), com origem unicelular a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas localizadas na região da protuberância. Destaque à presença de citoplasma denso, com elevado conteúdo protéico, vacúolos pequenos e nucléolo evidente. Rp = Região proximal do explante foliar; Mga = Meristema da gema adventícia; Pf = Primórdios foliares; asterisco preto = protuberância; setas verdes = gemas adventícias; setas azuis = traços de cordões de células procambiais; setas vermelhas = mucilagem (polissacarídeos); círculo vermelho = pró-embrião; N = nucléolo; V = vacúolo. Figuras A e B: Barras = 500 μm ; Figuras C e D: Barras = 50 μm 64

Figura 17 - Fotomicrografias de explantes foliares de *Neoregelia* sp.

A – Região proximal do explante foliar com o desenvolvimento de raízes adventícias; B – Raiz adventícia em corte longitudinal; C – Raiz adventícia; D – Raiz adventícia em corte transversal. Rp = Região proximal do explante foliar; Mar = Meristema apical radicular; Pr = Procâmbio; CV = cilindro vascular; PRd = Pêlos radiculares; asterisco preto: protuberância; seta amarela = raiz adventícia em secção longitudinal. Figura A: Barra = 500 μm ; Figura B e C e D: Barras = 100 μm 65

Figura 18 - Fotomicrografias de secções paradérmicas da região proximal de explantes foliares de *Neoregelia* sp.

A e B – Gemas e raízes adventícias desenvolvidas na protuberância; Rp = Região proximal do explante foliar; Mga = Meristema da gema adventícia; Mar = Meristema apical radicular; Pr = Procâmbio; Pf = Primórdios foliares; asteriscos brancos e pretos = protuberância; setas verdes =

gemas adventícias; setas amarelas = raízes adventícias. Figuras A e B: Barras = 500 μm 66

Figura 19 - Fotomicrografias de secções paradérmicas da região proximal de explantes foliares de *Neoregelia* sp. A – Embrião somático de origem unicelular a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas localizadas na protuberância; B – Detalhe do embrião somático observado em A. Rp = Região proximal do explante foliar; Zm = Zona meristemática. Figuras A: Barra = 20 μm ; Figura B: Barra = 50 μm 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição básica dos meios nutritivos MS, ½ MS e WPM utilizados para o experimento de multiplicação	37
Tabela 2 - Testes histoquímicos para a identificação de componentes celulares específicos, baseado na coloração	41
Tabela 3 - Parâmetros qualitativos do comportamento das microcepas de <i>Neoregelia</i> sp em relação ao meio de cultura e tempo de cultivo <i>in vitro</i>	45
Tabela 4 - Resultados da análise de variância do peso da matéria fresca e da matéria seca de brotações de <i>Neoregelia</i> sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM)	47
Tabela 5 - Taxa de crescimento relativo (%) da produção de matéria seca em brotações de <i>Neoregelia</i> sp na multiplicação <i>in vitro</i> nos meios de cultura MS, ½ MS e WPM	48
Tabela 6 - Resultados da análise de variância para o teor de nitrogênio total das brotações de <i>Neoregelia</i> sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM)	48
Tabela 7 - Comparação quanto a disponibilidade de fontes nitrogenadas entre os meios de cultura MS, ½ MS e WPM	49
Tabela 8 - Resultados da análise de variância para os teores de nitrogênio amoniacal (N-NH ₄ ⁺) nas brotações de <i>Neoregelia</i> sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM)	50
Tabela 9 - Resultados da análise de variância para os teores de nitrogênio nítrico (N-NO ₃ ⁻) nas brotações de <i>Neoregelia</i> sp ao final de 4 subcultivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM)	51
Tabela 10 - Resultados da análise de variância dos teores de nitrogênio proteico nas brotações de <i>Neoregelia</i> sp ao final de 4 subcultivos com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM)	52

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

½ MS - meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de sais e vitaminas

AIA - Ácido indolacético

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – 6-Benzilaminopurina

GOGAT - Glutamato sintetase (GOGAT)

GS – Glutamina sintetase

iP – 2-isopenteniladenina

iPR – 2-isopenteniladenosina

MS – Meio de cultura Murashige e Skoog (1962)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NR – Nitrato redutase

NiR – Nitrito redutase

PAS – Ácido Periódico de Schiff

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TDZ – Thiadizuron

WPM – meio de cultura de Lloyd e McCown (1980)

Z – Zeatina

ZR – Zeatina ribosídica

µm – Micromolar

1 INTRODUÇÃO

Plantas da família Bromeliaceae apresentam grande importância ecológica e econômica, seja como planta ornamental ou para consumo como alimento. Dessa forma, o estabelecimento de protocolos que visem a propagação de espécies nessa família tem sido objeto de constante estudo, a fim de suprir as necessidades crescentes do mercado.

Dentre as técnicas de propagação vegetal, a cultura de tecidos, de forma geral, apresenta muitas vantagens, mas especificamente para a família Bromeliaceae, que conta com espécies ameaçadas de extinção, a técnica permite a conservação do germoplasma e a multiplicação em larga escala de genótipos de interesse comercial, o que certamente reduziria o interesse extrativista nestas espécies, colaborando de forma indireta com sua recuperação na natureza.

Um dos primeiros passos para se iniciar a cultura *in vitro* de uma espécie é a escolha do meio de cultura, visto que cada espécie apresenta necessidades nutricionais específicas. As bromélias, por sua vez, apresentam particularidades ainda maiores, pois são adaptadas a ambientes pobres em nutrientes.

Dentre os macronutrientes presentes nos protocolos de meio de cultura, o nitrogênio destaca-se por ser essencial no metabolismo de aminoácidos, proteínas, enzimas e na síntese endógena de hormônios. Dessa forma, maior atenção deve ser dada tanto à concentração deste nutriente, quanto à forma iônica disponível no meio de cultura.

Outro aspecto importante refere-se aos diferentes tipos de explantes que podem ser utilizados no cultivo *in vitro*, visto que a escolha do explante é dependente da finalidade da pesquisa, logo quando o interesse é manter a diversidade genética utilizam-se plântulas germinadas *in vitro*, porém quando o objetivo é a propagação de um genótipo específico, clonagem, deve-se utilizar os processos morfogênicos para a desdiferenciação de tecidos especializados e posterior indução regenerativa.

Considerando que os processos regenerativos são complexos, visto que envolvem diversos fatores como: genótipo, fonte e condições fisiológicas do explante, meio de cultura utilizado, combinação de reguladores de crescimento, condições ambientais de pH e luminosidade, diversas frentes experimentais são necessárias à obtenção de um protocolo eficaz de micropropagação.

Neste contexto, o estudo sobre os processos regenerativos torna-se de suma importância para o sucesso do cultivo *in vitro*, visto que diferentes vias morfogênicas podem ser seguidas pelas células dos explantes. Neste sentido, as duas principais vias de regeneração

são: a embriogênese somática (embriões somáticos) e/ou organogênese adventícia (gemas adventícias), a partir da indução de competência totipotente (embriogênica) ou pluripotente (organogênica) em determinada(s) célula(s) dos explantes submetidos às condições de cultivo específicas.

Para tanto, a aquisição de competência de uma determinada célula ou grupo de células, a uma via específica de desenvolvimento (embriogênese somática ou organogênese adventícia) deve ser monitorada por meio de análises histológicas e histoquímicas, que permitem evidenciar os padrões das divisões celulares e os fatores envolvidos na aquisição de competência.

Considerando a importância da família Bromeliaceae e a necessidade do aprimoramento de protocolos de micropropagação, o presente trabalho visou analisar o desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Neoregelia* sp, bem como monitorar as vias morfogênicas a partir de explantes foliares, identificando a(s) célula(s) competente(s) à embriogênese somática e/ou organogênese adventícia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atuação de diferenças quantitativas e qualitativas em meios de cultura no desenvolvimento *in vitro* de brotações de microcepas e explantes foliares de *Neoregelia* sp e monitorar as vias morfogênicas dos propágulos obtidos em explantes foliares, identificando a(s) célula(s) competente(s) à embriogênese somática e/ou organogênese adventícia.

2.2 Objetivos específicos

- I. Identificar, por meio de análises morfofisiológicas, quais as constituições dos meios de cultura, MS, ½ MS ou WPM, com concentrações fixas dos reguladores de crescimento ANA e BAP, proporcionaram as melhores respostas em brotações de microcepas;
- II. Identificar, por meio de análises morfofisiológicas, quais as constituições dos meios de cultura, MS, ½ MS ou WPM, com concentrações fixas dos reguladores de crescimento ANA e BAP, proporcionaram as melhores respostas em explantes foliares;
- III. Evidenciar, por meio da análise de nitrogênio total e fracionado, o uso das fontes de nitrogênio disponíveis nos meios de cultura MS, ½ MS e WPM e se existe relação com as repostas morfogênicas apresentadas pelas brotações de microcepas estabelecidas e cultivadas *in vitro*;
- IV. Monitorar, por meio de análises histológicas e histoquímicas, respectivamente, alterações estruturais e no *status* metabólico (substâncias ergásticas) dos explantes foliares durante a indução e desenvolvimento das vias morfogênicas em meio de cultura MS, suplementado com os reguladores de crescimento ANA e BAP.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bromeliaceae

A família Bromeliaceae é representada por aproximadamente 3.348 espécies distribuídas em 58 gêneros (LUTHER, 2012). São monocotiledôneas encontradas em diversas condições de altitude, temperatura e umidade, sendo compostas por plantas terrestres, saxícolas e epífitas (WENDT, 1999). Podem apresentar metabolismo fotossintético C3, C3-CAM facultativo, sendo que a maioria apresenta metabolismo CAM (Crassulacean Acid Metabolism) fator essencial para a adaptação dessa família a ambientes áridos, visto sua eficiência na redução da perda de água durante a transpiração, pois os estômatos abrem-se somente a noite, o que acarreta também em limitada taxa fotossintética, tornando o crescimento das bromélias lento (MARTIN, 1994; MAJEROWICZ, 2004). Possuem grande diversidade, sendo seu endemismo marcante, bem como desempenham um papel fundamental no ciclo de nutrientes e no uso da água, tornando-se essenciais à manutenção da biodiversidade nos ecossistemas (MENGARDA et al., 2009; COXSON, NADKARNI, 1995).

Além de toda a importância ecológica, membros dessa família apresentam valor econômico em muitos países, podendo ser utilizadas na produção de fibras; na alimentação humana, como o abacaxi *Ananas comosus* L. Merr., o representante mais comercializado da família Bromeliaceae; destacando-se também o uso medicinal e como planta ornamental em projetos de paisagismo (BENNET, 2000; MENGARDA et al., 2009).

Em relação à reprodução de espécies da família Bromeliaceae, pode ocorrer naturalmente de duas formas: sexuada ou assexuada. A sexuada ocorre pela fecundação e formação de sementes, o que é fundamental para a manutenção da diversidade genética da espécie (ARANDA-PEREZ; RODRIGUEZ, 2006). Porém, devido ao baixo sucesso de germinação e ao prolongado estágio juvenil, a demanda comercial por plantas não é suprimida apenas por meio do cultivo de sementes (MERCIER; KERBAUY, 1995; HOSOKI; AHIRA, 1980). Na reprodução assexuada, ocorre a emissão de brotos laterais a partir de gemas axilares, em um processo bastante lento e também incapaz de suprir o mercado de comercialização de bromélias (ARANDA-PEREZ; RODRIGUEZ, 2006).

O gênero *Neoregelia* L.B.Sm., objeto de estudo deste trabalho, é representado por espécies terrestres, saxícolas e principalmente epífitas, apresentando tamanho variado, folhas geralmente com margem espinosa-serreadas, de inserção rosuladas (em rosetas) formando um “tanque” na região basal da superfície adaxial, onde se insere a inflorescência (SMITH;

DOWNS, 1983). No “tanque”, além do acúmulo de água são encontradas diversas fontes de nitrogênio utilizadas para a nutrição da planta como, nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), uréia, aminoácidos e proteínas (INSELSBACHER et al., 2007).

Várias espécies desse gênero são endêmicas e amplamente utilizadas como ornamentais, sofrendo fortíssima pressão por extrativismo, com a coleta ilegal a fim de abastecer o mercado de paisagismo (CARNEIRO et al., 1999). Segundo Andrade e Demattê (1999), o gênero *Neoregelia*, está entre os mais comercializados para o uso paisagístico no estado do Rio de Janeiro.

Nesse contexto, a crescente importância econômica da família Bromeliaceae tem despertado o interesse na aplicação de técnicas de cultura de tecidos que possibilitem à propagação em larga escala de espécies, tanto para a captura e fixação de ganhos genéticos, como para efeitos ornamentais, quanto para a sua conservação, permitindo ainda a exploração eficiente das mesmas (DROSTE et al., 2005; DAL VESCO, 2010).

3.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é o nome atribuído ao cultivo asséptico *in vitro* de células, tecidos, órgãos ou plantas inteiras sob controle nutricional e das condições ambientais, que envolvem pH, temperatura, trocas gasosas entre outros fatores (HUSSAIN et al., 2012).

Com isso, a cultura de tecidos engloba diversas técnicas, dentre as quais a micropropagação, que representa a aplicação mais concreta e de maior impacto, visto que permite obter em larga escala e em reduzido intervalo de tempo, plantas livres de patógenos e praticamente idênticas à original, sendo utilizada como alternativa à propagação tradicional, bem como em programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994).

Em relação à família Bromeliaceae, os primeiros estudos envolvendo a cultura de tecidos foram realizados por Jones e Murashige (1974) com culturas de ápices caulinares de diversas espécies de bromélias em meio MS suplementados com ANA, AIB e AIA, onde obtiveram a formação de brotos. Desde então, estudos envolvendo a cultura de tecidos de espécies dessa família são realizados com o objetivo de definir protocolos para produção comercial (MERCIER; KERBAUY, 1997), conservação (DROSTE et al., 2005), conhecimento fisiológico, como produção endógena de hormônios (MERCIER et al., 1997) e necessidades nutricionais (KANASHIRO et al., 2007).

Diferentes explantes podem ser utilizados em protocolos de cultura de tecidos, sendo que, especificamente em relação à família Bromeliaceae têm-se utilizado: plântulas germinadas *in vitro* que asseguram a variabilidade genética natural da espécie estudada (MEKERS, 1977; DROSTE et al., 2005), brotos laterais (MATHEWS; RAO, 1992), ápices caulinares (PARDO et al., 2008), segmentos florais (HUANG et al., 2010) e explantes foliares (MERCIER; KERBAUY, 1992; SCHERER et al. 2013).

Uma estratégia para a obtenção de bons explantes é citada por Mercier e Kerbauy (1997), que recomendam o uso de plântulas germinadas *in vitro* para a obtenção de plântulas assépticas e a partir destas iniciar a cultura de explantes como segmentos nodais e explantes foliares. Ainda em relação aos explantes, Burr e Tinus (1996) propõem que, para diminuir a variabilidade de respostas em estudos fisiológicos, é indicado utilizar como fonte de explante plantas micropropagadas de uma única planta mãe, evitando-se dessa forma a influência de variação genética natural entre os indivíduos nos resultados encontrados.

Diversos estudos envolvendo a micropropagação de espécies da família Bromeliaceae têm utilizado explantes foliares, visto o elevado potencial regenerativo da região proximal das folhas, dentre os quais destacam-se os estudos com *A. comosus* (MATHEWS; RANGAN, 1979; TENG, 1997; SONEJI; RAO; MHATRE, 2002; MERCIER et al., 2003; SRIPAORAYA et al., 2003; FIROOZABADY; MOY, 2004; HAMASAKI; PURGATTO; MERCIER, 2005; FERREIRA, 2009; SCHERER et al., 2013), *Dickia macedoi* (MERCIER; KERBAUY, 1993), *Neoregelia cruenta* (CARNEIRO et al., 1999), *Vriesea reitzii* (ALVES; DAL VESCO; GUERRA, 2006; RECH FILHO; DAL VESCO; GUERRA, 2009; DAL VESCO; GUERRA, 2010; PRADO, 2012), *V. fosteriana* (MERCIER; KERBAUY, 1992), *V. scalaris* (SILVA et al., 2009) *Quesnelia quesneliana*, *V. poelmannii*, *Aechmea fasciata* e *Guzmania spp.* (HOSOKI; ASAHIRA, 1980).

3.3 Morfogênese

Para compreensão dos padrões de desenvolvimento que ocorrem durante a cultura de tecidos é necessário entender os eventos morfogênicos que podem ocorrer. Segundo Hicks, 1980 a morfogênese vegetal *in vitro* pode ocorrer por duas vias: a organogênese adventícia ou a embriogênese somática.

A organogênese adventícia é a indução à formação de um novo órgão, seja este proveniente do desenvolvimento de uma gema ou de raízes adventícias. As gemas adventícias são oriundas de um processo morfogênico onde ocorre a formação de uma estrutura unipolar

com conexão vascular com o explante (GREEN, 1980; THORPE, 1993; ALMEIDA et al., 2012). Por outro lado, na embriogênese somática, célula(s) somática(s) desenvolve(m)-se dando origem a um embrião (somático) e este por sua vez a uma planta, sem a ocorrência prévia da fusão de gametas, ou seja, ocorre o desenvolvimento de uma estrutura bipolar representada pelos meristemas apicais caulinar e radicular, isenta de conexão vascular com o explante (THORPE, 1993; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Outro aspecto importante, é que tanto a organogênese adventícia quanto a embriogênese somática podem ocorrer de forma direta ou indireta, sendo que nesta última, os eventos morfogênicos são induzidos em calos desenvolvidos no explante, cujas células respondem com formação de uma gema adventícia ou de um embrião somático (HICKS, 1980). Porém, durante o processo de micropropagação, a formação de calos é indesejável, uma vez que a constituição cromossômica deste material é geralmente instável, podendo originar variantes genéticas, evento denominado variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

Os eventos morfogênicos discutidos acima estão estreitamente relacionados aos conceitos de diferenciação, dediferenciação, competência e determinação celular. Segundo Handro e Floh (1990) quando um fragmento de tecido vegetal é retirado de sua condição natural e exposto ao meio de cultura, com nutrientes e reguladores de crescimento, torna-se livre do controle que estava submetido no organismo, e fica exposto a uma nova condição, onde a capacidade de divisão celular pode ser readquirida (dediferenciação), podendo o genoma expressar-se de novas formas, conduzindo a novos padrões de diferenciação que geram novas estruturas. Dessa forma, pode-se dizer que a dediferenciação é resultado da formação de células competentes, também denominadas células-tronco, que dependendo do estímulo, podem seguir diferentes rotas morfogênicas, estas após a transferência para meios de cultura específicos, tornam-se determinadas, isto é, comprometidas com uma rota específica de desenvolvimento, no entanto, as interações entre a indução de morfogênese por reguladores de crescimento endógenos e exógenos sobre essas células permanecem obscuros (KERBAUY, 1999; ALMEIDA et al., 2012).

Nesse contexto, percebe-se que o processo de diferenciação é dependente da competência das células, pois sabe-se que determinada(s) célula(s) pode(m) atuar como célula(s)-tronco de três diferentes formas: como multipotentes, que possuem a habilidade de originar diferentes tipos de células dentro de uma linhagem celular específica; como pluripotentes, que possuem habilidade à diferenciação na maioria dos tipos celulares, originando, por exemplo, gemas adventícias (organogênese adventícia); e finalmente como

células totipotentes, que podem originar todos os tipos celulares requeridos ao desenvolvimento do corpo vegetal, ou seja, com o desenvolvimento de embriões somáticos (embriogênese somática) com origem unicelular ou multicelular (ALMEIDA et al., 2012; GRANER, 2013), mediante a influência dos níveis hormonais endógenos e ao posicionamento das células no corpo vegetal (HOCHEDLINGER; PLATH, 2009; VERDEIL et al., 2007; De SMET; BEECKMAN, 2011).

Dessa forma, entende-se que toda célula vegetal é competente para um ou mais sinais regulatórios, e que a competência celular do explante em induzir rotas regenerativas depende da sua capacidade de resposta aos sinais extracelulares, entre eles: a composição do meio de cultura, ao tipo e balanço dos reguladores de crescimento, ao ambiente de cultivo e a juvenilidade dos tecidos e órgãos do explante (OSBORNE; MCMANUS, 2005; PREECE, 2008; GAHAN; GEORGE, 2008).

Porém, nem sempre um explante apresenta competência exclusiva a um dos eventos morfogênicos (organogênese adventícia ou embriogênese somática). Sripaoraya et al. (2003) e Firoozabady e Moy (2004) obtiveram a partir de explantes foliares competência responsiva tanto para a organogênese adventícia, quanto para embriogênese somática em *A. comosus* na dependência do tratamento utilizado. Contudo, os eventos podem ocorrer simultaneamente como o obtido por Almeida et al. (2012) e Graner (2013), que observaram organogênese adventícia e embriogênese somática, podendo esta apresentar origem uni ou multicelular em explantes de *Bactris gasipaes*.

Com isso, a morfogênese vegetal *in vitro* pode ser definida como o resultado entre os processos de crescimento (mudanças quantitativas) e diferenciação (mudanças qualitativas), que ocorrem pela divisão e especialização celular, formando uma estrutura organizada (HANDRO; FLOH, 1990).

3.4 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado na técnica de cultura de tecidos fornece as substâncias essenciais para o crescimento e atuam, em grande parte, no padrão de desenvolvimento do explante. Dessa forma, os meios de cultura existentes se baseiam nas exigências nutricionais da planta como um todo, considerando que algumas modificações são comumente requeridas para atender às necessidades *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Os principais componentes de um meio de cultura são: água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, podendo

ser utilizados nas formas sólida, pela adição de agentes solidificantes como o agar-agar, ou líquida; sendo que os meios líquidos possuem diversas vantagens como: preparo rápido, menor custo, maior disponibilidade e homogeneidade de nutrientes (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Ramage e Williams (2002) ressaltam que pouca atenção é dada aos efeitos dos nutrientes durante o desenvolvimento *in vitro*, visto que os nutrientes minerais são os principais componentes do meio de cultura e que, frequentemente, apenas um meio de cultura é utilizado durante todo o cultivo, embora a formulação usada possa não ser a melhor para todos os estágios de desenvolvimento do explante.

Outro aspecto importante em relação à disponibilidade de nutrientes foi proposto por Marschner (1995) que ressaltou a influência dos nutrientes na síntese e ação dos hormônios endógenos, com destaque às fontes nitrogenadas, as quais estão relacionadas à síntese de citocininas em plantas. Alguns estudos corroboram o proposto por Marschner (1995), os quais revelaram que dependendo da fonte nitrogenada em uso, pode ocorrer uma variação acentuada nos níveis endógenos da auxina AIA (ácido indolacético) e de diversas citocininas, como iP (2-isopenteniladenina), iPR (2-isopenteniladenosina), Z (zeatina) e ZR (zeatina ribosídica), em diferentes espécies de bromélias (MERCIER et al., 1997; MERCIER; KERBAUY, 1998).

Portanto, os nutrientes minerais exercem um forte papel na regulação da morfogênese vegetal e não apenas no crescimento. Estudos mostraram que a absorção, transporte e metabolismo dos diferentes nutrientes variam durante os estágios de desenvolvimento dos órgãos e tecidos, ressaltando ainda, que o balanço entre nitrogênio, fósforo e cálcio parecem ser essenciais à morfogênese, enquanto potássio, magnésio e enxofre exercem papel de apoio (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Outro aspecto importante é o conhecimento sobre o uso dos nutrientes minerais pelas epífitas da família Bromeliaceae, visto que são adaptadas a ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes, apresentando diferentes mecanismos de absorção de fontes pouco nutritivas, resultando em uma elevada eficiência no uso dos nutrientes (BENZING; RENEFROW, 1980). Apesar de existirem diversos trabalhos sobre a adequação de meios de cultura, a maior parte tem como objetivo estudos sobre o tipo e concentração dos reguladores de crescimento, carecendo estudos relacionados à formulação nutricional *in vitro* (ENDRES, MERCIER, 2001). Segundo Preece (2008), o balanço adequado dos nutrientes minerais permite reduzir as concentrações de reguladores de crescimento nos meios de cultura, o que favorece a manutenção da fidelidade genética das plantas micropropagadas.

3.5 Metabolismo do nitrogênio

Dentre os trabalhos que abordam a importância dos nutrientes minerais, a grande maioria está relacionada ao nitrogênio, visto que é o constituinte de diversos componentes celulares (aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas) e são limitantes no crescimento dos vegetais, sendo o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+) as principais formas nitrogenadas absorvidas pelas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O nitrato (NO_3^-) é absorvido por processo ativo e reduzido a amônio (NH_4^+) por um processo que ocorre em duas etapas, a primeira delas é catalisada pela nitrato redutase (NR), onde o nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito (NO_2^-). Na segunda etapa, a nitrito redutase (NiR) catalisa a redução do nitrito (NO_2^-) a amônio (NH_4^+) que enfim pode ser assimilado em aminoácidos e proteínas. O amônio (NH_4^+), por sua vez, é absorvido por processo ativo, quando em baixas concentrações e por processo passivo sob elevadas concentrações. Após a absorção, o íon é rapidamente assimilado na forma orgânica, pela ação da glutamina sintetase (GS) ou da glutamato sintetase (GOGAT), pois o acúmulo do mesmo é prejudicial para a planta, uma vez que pode conduzir à morte ou prejudicar alguns processos metabólicos como a respiração (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Diante disso, as atividades de enzimas que catalisam reações de conversão de formas nitrogenadas são importantes para trazer respostas a alguns aspectos do metabolismo do nitrogênio em bromélias. Nievola et al. (2001), compararam as atividades das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) entre *V. fosteriana*, uma espécie saxícola com tanque, e *Tillandsia pohliana*, uma espécie epífita sem tanque, sob a disponibilidade de nitrato, amônio e nitrato de amônio, os resultados mostraram que a espécie com tanque apresentou atividade da glutamina sintetase (GS) mais elevada e que a baixa atividade da glutamina sintetase (GS) encontrada na espécie epífita possivelmente está relacionada a adaptação a ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes.

Ainda nesse contexto Takahashi e Mercier (2011) investigaram possíveis diferenças quanto a capacidade de assimilação do nitrogênio em diferentes regiões foliares de *V. gigantea*, uma bromélia epífita com tanque, a qual foi submetida a disponibilidade de nitrato/amônio ou ureia. Constatando-se que independente da fonte nitrogenada utilizada a atividade da nitrato redutase (NR) e da urease foi maior na porção basal das folhas, ao contrário do observado para glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH) onde a maior atividade foi na região apical. Com isso os resultados sugerem que a porção basal está

envolvida na redução de nitrato e hidrólise da uréia, enquanto a região apical parece ser a responsável pela assimilação de amônio.

3.6 Nitrogênio no meio de cultura

A principal fonte de nitrogênio utilizada em protocolos de cultura de tecidos é o nitrato (SATHYANARAYANA; BLAKE, 1994), visto que diversos estudos evidenciaram sua relação favorável com a morfogênese e a regulação do desenvolvimento *in vitro* da planta (SCHEIBLE et al., 1997a; 1997b; RAMEGE; WILLIAMS, 2002).

O meio de cultura mais comumente utilizado na micropropagação de espécies da família Bromeliaceae é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em sua formulação original, como nos estudos com *Aechmea fasciata* e *Guzmania* ssp. (PIERIK et al., 1984), *Aechmea victoriana* e *A. dactylina* (DIJCK et al., 1988), *Ananas comosus* (MATHEWS; RANGAN, 1979; ZEPEDA; SAGAWA, 1981; GUERRA et al., 1999; SONEJI; RAO; MHATRE, 2002; FIROOZABADY; MOY, 2004; CANTO et al., 2004), *Tillandsia cyanea* (PIERIK; SPRENKELS, 1988), *N. carolinae* (TOMBOLATO et al., 1991), *N. cruenta* (CARNEIRO, 1999; MENGARDA, 2009), *Q. quesneliana*, *V. poelmanni*, *Aechmea fasciata* e *Guzmania* spp (HOSOKI; ASAHIRA 1980), *Vriesea* spp. (ALVES; DAL VESCO; GUERRA, 2006; BENCKE; DROSTE, 2008).

Porém, Mercier e Kerbauy (1992), avaliaram o desenvolvimento de *V. fosteriana* nos meios de cultura MS, ½ MS (meio MS com metade da concentração dos sais) e meio Knudson (1946), um meio de cultura mais pobre em nutrientes em relação ao meio MS, obtendo os melhores resultados com este último, seguido pelo meio MS e ½ MS.

Neste contexto, é muito provável que nem todas as espécies precisem das elevadas concentrações de fontes nitrogenadas presentes no meio de cultura MS, conforme demonstraram alguns estudos realizados com diluições do meio de cultura MS original, ou apenas alterando a concentração do nitrogênio.

Grossi (2000) estudou diferentes concentrações de nitrogênio (1,78; 7,5 e 30,0 mM.L⁻¹) no cultivo *in vitro* de *Aechmea nudicaulis*, sendo a concentração 7,5 mM.L⁻¹ a mais vantajosa, um valor bem inferior àquele presente na formulação MS original. De forma similar, Endres e Mercier (2001), verificaram que *V. gigantea* foi mais eficiente em absorver nitrogênio sob menores concentrações desse nutriente. Já, Tamaki, Mercier e Nievola (2007) realizaram experimentos com diferentes concentrações do meio de cultura MS original (1/2, 1/5, 1/10, 1/60 e 1/100) na micropropagação de *A. comosus* variedade “Smooth Cayenne” e

não observaram diferença significativa no desenvolvimento dos explantes nas concentrações de MS, MS/2 e MS/5.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização da área experimental

Os experimentos de morfogênese, análises histológicas e histoquímica foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, de enraizamento e aclimatização no Laboratório de Fisiologia das Árvores e Viveiro Florestal pertencentes ao Departamento de Ciências Florestais, e de análises químicas no Laboratório de Tecidos Vegetais, do Departamento Ciência do Solo, todos na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ)/USP, Piracicaba – SP.

4.2 Material vegetal

Os explantes de *Neoregelia* sp utilizados para todos os experimentos deste trabalho são oriundos de um micro jardim clonal estabelecido pelo Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas/LCB/ESALQ/USP.

4.2.1 Estabelecimento do micro jardim clonal

Para o estabelecimento do micro jardim clonal, plântulas germinadas *in vitro* em meio de cultura constituído por sais de Murashige e Skoog (1962) acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹), mio-inositol (100 mg.L⁻¹), tiamina (0,10 mg.L⁻¹), sem o acréscimo de reguladores de crescimento (meio básico), foram coletadas e transferida para o mesmo meio de cultura básico suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de ANA e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (meio de multiplicação).

Após 90 dias, com renovação do mesmo meio de multiplicação a cada 30 dias, uma única microcepa foi isolada, teve seus brotos individualizados e transferidos para o mesmo meio de multiplicação onde permaneceram por mais 90 dias, com subcultivos a cada 30 dias.

Posteriormente, as microcepas formadas foram transferidas para o meio de cultura básico, permanecendo nestas condições por 90 dias, com subcultivos a cada 30 dias para renovação do meio de cultura. A partir desse período os experimentos foram iniciados e o micro jardim clonal foi mantido em meio de cultura básico com renovação do meio de cultura a cada 30 dias (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da sequência metodológica utilizada para o estabelecimento dos experimentos

4.3 Condições de cultivo

Para o estabelecimento e manutenção do micro jardim clonal e para todos os experimentos, não foi acrescido agente geleificante aos meios de cultura (meio líquido), o pH foi ajustado a 5,8 e autoclavados por 30 minutos a 121° C. Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controlados [$25 \pm 2^\circ \text{C}$; irradiação de $42 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR)] em fotoperíodo de 16 horas.

4.4 Multiplicação a partir de brotações de microcepas

Para o desenvolvimento desse experimento, brotos procedentes do micro jardim clonal (item 4.3), com aproximadamente dois centímetros de comprimento, sem raízes e com quatro folhas totalmente expandidas, foram transferidas para os três meios de cultura: MS, ½ MS (meio MS com metade da concentração de sais e vitaminas) e WPM (LLOYD;

McCOWN, 1980) (Tabela 1), todos suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,50 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Foram realizadas cinco repetições com cinco explantes para cada tratamento, além disso, os explantes foram mantidos *in vitro* nos mesmos tratamentos por 120 dias, com subcultivos a cada 30 dias para renovação do meio de cultura.

Tabela 1 - Composição básica dos meios nutritivos MS, ½ MS e WPM utilizados para o experimento de multiplicação

COMPONENTE	PESO MOLECULAR	MS ⁽¹⁾	½ MS	WPM ⁽²⁾
Macronutrientes	(g)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	80,04	1.650,00	825,00	400,00
KNO ₃	101,11	1.900,00	950,00	–
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	440,00	220,00	96,00
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,15	–	–	556,00
KH ₂ PO ₄	136,09	170,00	85,00	170,00
K ₂ SO ₄	174,26	–	–	990,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	370,00	185,00	370,00
Micronutrientes	(g)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	372,24	37,300	18,65	37,300
Fe(SO ₄).7H ₂ O	278,02	27,800	13,90	27,800
MnSO ₄ .H ₂ O	169,01	16,900	8,45	16,900
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54	8,600	4,30	8,600
H ₃ BO ₃	61,83	6,200	3,10	6,200
KI	165,99	0,830	0,415	–
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	0,025	0,0125	0,250
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,250	0,125	0,250
CoCl ₂ .6H ₂ O	237,93	0,025	0,0125	–
Vitaminas	(g)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
Tiamina-HCl	337,30	0,10	0,05	1,00
Piridoxina-HCl	205,60	0,50	0,25	1,00
Ácido Nicotínico	123,11	0,50	0,25	1,00
Pantotenato Ca ²⁺	476,54	–	–	1,00
Biotina	244,30	–	–	0,01
Aminoácidos	(g)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
Cisteína	121,16	–	–	–
Glicina	75,07	2,00	1,00	1,00
Fonte de carbono	(g)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
Mio-inositol	180,16	100,00	50,00	100,00
Sacarose	342,30	30.000,00	30.000,00	30.000,00

⁽¹⁾ adaptado segundo Murashige e Skoog (1962), ⁽²⁾ adaptado segundo Loyd e McCown (1980)

4.4.1 Avaliações morfofisiológicas das brotações de microcepas

A cada subcultivo (30 dias), avaliou-se o número médio de brotos desenvolvidos por explante (brotações das microcepas) e os parâmetros qualitativos: homogeneidade da multiplicação, tamanho dos brotos, vigor das microcepas, ocorrência de oxidação, contaminação e manifestação bacteriana endofítica.

Para a mensuração do número médio de brotos desenvolvidos nas brotações, a cada subcultivo, no momento da transferência do material foi realizada a contagem dos brotos desenvolvidos, sem isolá-los do explante original.

Para avaliar a homogeneidade da multiplicação, foram atribuídas as denominações homogêneo ou heterogêneo. Além disso, para o parâmetro tamanho dos brotos desenvolvidos, atribuíram-se os valores qualitativos: menores, médios ou maiores, de acordo com as respostas observadas. Para o parâmetro vigor, foram estabelecidas as notas: ótimo, bom e regular, segundo Almeida (2012).

Após quatro subcultivos (120 dias) as microcepas (tufos de brotos) foram pesadas individualmente e separadas para avaliação do peso da matéria fresca, e então, armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em estufa a 60° C até obtenção de peso constante para a avaliação do peso da matéria seca e da taxa de crescimento relativo.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3x4), testando-se três meios de cultura e quatro sucessivos cultivos *in vitro*, usando cinco repetições com cinco explantes por repetição.

4.4.2 Avaliação do nitrogênio total e nitrogênio fracionado

Após a mensuração do peso de matéria seca, as microcepas foram separadas para análise química do teor de nitrogênio total e nitrogênio fracionado.

4.4.3 Aclimatização das brotações de microcepas

Brotos, procedentes do micro jardim clonal (item 4.3), com aproximadamente dois centímetros de comprimento, sem raízes e com quatro folhas totalmente expandidas, foram transferidos para os três meios de cultura utilizados no experimento de multiplicação a partir de brotações de microcepas (item 4.4). Os brotos foram mantidos por 120 dias nos três meios de cultura, com subcultivos a cada 30 dias para renovação do meio de cultura. No total foram mantidos dois potes com cinco brotos para cada meio de cultura avaliado.

Ao final dos 120 dias, 15 brotos com tamanho de aproximadamente três centímetros de comprimento, foram isolados e transferidos para tubetes contendo substrato Plantmax® e vermiculita na proporção 2:1 e mantidos em casa de vegetação com aspersão por 30 dias.

Passados os primeiros 30 dias foram transferidos para sombrite recebendo água por rega a cada dois dias. Nessa condição avaliou-se a porcentagem de sobrevivência a cada 30 dias por um período de 120 dias.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3x4) com três tratamentos e quatro épocas de avaliações, composto por 15 repetições, cada uma com um broto.

4.4.4 Procedimentos estatísticos

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($P<0,05$) e Lilliefors ($P<0,05$). Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA, $P<0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ($P<0,05$) e, os dados dos fatores quantitativos foram submetidos a análise de regressão polinomial ($P<0,05$). O software STATISTICA 7.0 (StaSoft Inc., Tulsa – OK, USA) foi utilizado na análise de variância e os parâmetros dos modelos de regressão estimados pelo software CURVE EXPERT 1.3 (HYAMS, 2005).

4.5 Multiplicação a partir de explantes foliares

Este experimento foi desenvolvido com o isolamento das duas primeiras folhas, presentes respectivamente no primeiro e segundo nó no sentido ápice-base de brotações provenientes do banco de explantes (item 4.3), as quais foram transferidas para tubos de ensaio contendo cinco mililitros de cada um dos três meios de cultura utilizados no experimento de multiplicação (item 4.4). Foram realizados quatro subcultivos de 30 dias cada, totalizando 120 dias em tratamento.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3x4), testando-se três meios de cultura e quatro cultivos *in vitro* sucessivos, contendo cinco repetições com dois explantes para cada tratamento.

4.5.1 Avaliações morfofisiológicas dos explantes foliares

A cada subcultivo (30 dias), avaliou-se o número médio de brotos desenvolvidos por explante e os parâmetros qualitativos: vigor das brotações, ocorrência de oxidação, contaminação e manifestação bacteriana endofítica.

A cada subcultivo, no momento da transferência do material, realizou-se a mensuração do número de brotos desenvolvidos nos explantes foliares, destacando-se que a contagem seguiu o método não destrutivo, ou seja, os brotos desenvolvidos foram contados sem a excisão dos mesmos do explante original.

4.5.2 Procedimentos estatísticos

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Lilliefors ($P < 0,05$). Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA, $P < 0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados foram submetidos a análise de regressão polinomial ($P < 0,05$). O software STATISTICA 7.0 (StaSoft Inc., Tulsa – OK, USA) foi utilizado na análise de variância e os parâmetros dos modelos de regressão estimados pelo software CURVE EXPERT 1.3 (HYAMS, 2005).

4.6 Monitoramento das vias morfogênicas em explantes foliares

Folhas foram utilizadas para o monitoramento das vias morfogênicas em explantes foliares de *Neoregelia* sp, para tanto, 20 brotações procedentes do micro jardim clonal (item 4.3) tiveram isoladas as quatro folhas mais novas totalmente expandidas, considerando-se do ápice à base da planta, sendo que as duas primeiras folhas, pertencentes ao primeiro e segundo nó, foram denominadas F1, e as próximas duas, pertencentes respectivamente ao terceiro e quarto nó, foram denominadas F2.

Os pares de folhas (F1 e F2) foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 ml do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Tabela 1) suplementado com os reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP), respectivamente nas concentrações de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e sacarose ($30,0 \text{ g.L}^{-1}$).

4.6.1 Avaliações morfofisiológicas das vias morfogênicas em explantes foliares

As avaliações morfofisiológicas dos explantes foliares foram realizadas a cada cinco dias por um período de 30 dias, sendo que a cada avaliação foi anotado o número de explantes

responsivos, dentre estes, os que apresentavam respostas referentes à presença de protuberância, broto ou raiz, bem como a ocorrência de explantes senescentes. Além disso, os explantes responsivos foram coletados para as avaliações histológicas e histoquímicas dos processos morfogênicos.

4.6.2 Análise histológica e histoquímica dos explantes foliares

Explantes foliares de cada tipo de explante responsivo, ou seja, com a presença de protuberância, broto ou raiz, foram fixados em solução de Karnovsky (1965) e posteriormente desidratados em série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% v/v). Em seguida, as amostras foram inclusas em resina de hidroxiethyl metacrilato (Leica[®], Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos contendo as amostras foram seccionados a cinco micrometros de espessura empregando navalhas de aço do tipo C, acopladas a micrótomo rotativo manual, sendo que o plano de corte dos explantes variou de longitudinal radial a longitudinal paradérmico dependendo da posição dos tecidos envolvidos nos processos morfogênicos. As secções histológicas obtidas foram submetidas à coloração dupla com PAS (Periodic Acid/Shiff Reagent) e Naphtol Blue Black (FISHER, 1968) (Tabela 2), em seguida montadas em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan[®]) e por fim analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS[®] JENEMED2), sendo as imagens capturadas com câmera Premiere[®] MA88-300 na mesma escala.

Tabela 2 - Testes histoquímicos para a identificação de componentes celulares específicos, baseado na coloração

Teste empregado	Identificação dos componentes	Coloração	Referência
PAS	Amido	Cor-de-rosa à vinho	Fisher, 1968
PAS	Compostos fenólicos	Laranja	Fisher, 1968
Naphtol Blue Black	Proteínas	Azul marinho à preto	Fisher, 1968

4.6.3 Procedimentos estatísticos

A aplicação de métodos estatísticos rotineiros não foram pertinentes às análises relacionadas às análises histológicas e histoquímicas, a exemplo das pesquisas desenvolvidas

por Gueye (2009), Graner (2013) e Almeida et al. (2012), uma vez que foi enfatizado o monitoramento da origem e vias morfogênicas dos explantes foliares.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A opção por trabalhar com clones e não com plantas obtidas a partir de sementes, mostrou-se positiva, pois o uso de plantas clonadas para estudos morfofisiológicos diminuiu a variabilidade de respostas, visto que não houve variação genética entre as plantas analisadas, corroborando as observações de Burr e Tinus (1996).

5.1 Multiplicação a partir de brotações de microcepas

5.1.1 Avaliações morfofisiológicas

Nenhuma diferença em relação ao desenvolvimento do número médio de brotos foi observada entre os três meios de cultura testados (MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM) no primeiro subcultivo, apresentando média de dois brotos por explante (Figura 2A, B e C). No entanto, a partir do segundo subcultivo, estes valores foram mais representativos, observando-se média de oito brotos por explante nos meios MS e $\frac{1}{2}$ MS e seis brotos por explante no meio WPM (Figura 2A, B e C). O estabelecimento do número máximo de brotos formados pelos explantes nos meios de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS, foi caracterizado pelo terceiro subcultivo, apresentando a média de dez brotos por explante, ao passo que o meio de cultura WPM apresentou valores médios de oito brotos por explante (Figura 2A, B e C). No quarto subcultivo o meio de cultura WPM apresentou em média nove brotos por explante (Figura 2A, B e C), porém, não houve diferença entre os tratamentos, convém destacar que o meio de cultura WPM (Figura 2C) foi o que apresentou a curva padrão de crescimento (sigmoide), evidenciando cada uma das três fases (lag, log e estabilização).

Naves et al. (2003) comparou a multiplicação *in vitro* de *Alcantarea imperialis* sob diferentes concentrações dos meios de cultura MS e Knudson, todos suplementados com $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de thidiazuron (TDZ). Os resultados mostraram que o número médio de brotos formados no meio MS foi mais elevado em relação ao Knudson. Ainda segundo os autores, a concentração de nutrientes do meio de cultura pareceu influenciar o número de brotações emitidas em *Alcantarea imperialis*, visto que o meio Knudson por ser o meio de cultura mais pobre em nutrientes, apresentou o menor número médio de brotações em comparação ao MS. Em nosso estudo, também obtivemos uma menor formação de brotos no meio de cultura mais pobre em nutrientes (WPM), porém sem diferença estatística.

Um estudo realizado por Mengarda et al. (2009) avaliou o meio de cultura MS suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP na micropropagação da bromélia

N. cruenta por trinta dias e obteve número médio de 9,4 brotos por explante nesse período. Valores mais elevados dos reguladores de crescimento BAP e ANA no meio de cultura MS tornaram a resposta por formação de brotos mais rápida, porém sabe-se que concentrações elevadas de reguladores de crescimento podem acarretar variações somaclonais, indesejáveis em protocolos de micropropagação onde se quer multiplicar um genótipo específico (TAMAKI; MERCIER; NIEVOLA, 2007).

No entanto, estudos realizados com o *Ananas comosus* variedade “IAC Gomo-de-mel” onde foi testado o meio de cultura MS com diferentes concentrações de ANA e BAP, observou-se aos 95 dias de cultivo *in vitro*, média de 9,03 brotos por explante nas concentrações 1,0 mg.L⁻¹ de ANA e 1,0 mg.L⁻¹ BAP (FRÁGUAS et al., 2009), corroborando os resultados encontrados no presente trabalho, porém, utilizando-se uma concentração consideravelmente inferior dos reguladores de crescimento ANA (0,05 mg.L⁻¹) e BAP (0,5 mg.L⁻¹).

Figura 2 - Valores médios do número de brotações (NB) de *Neoregelia* sp ao longo de 4 subcultivos sucessivos (30 dias cada) em função dos meios de cultura de multiplicação MS (A), ½ MS (B) e WPM (C) suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ de ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP

Não se observou a presença de oxidação, contaminação ou manifestação bacteriana endofítica para os três meios de cultura testados (MS, ½ MS e WPM). Entretanto, com relação aos parâmetros qualitativos de homogeneidade, tamanho dos brotos e vigor das microcepas, verificou-se diversidade nas respostas (Tabela 3; Figura 3).

Em relação ao tamanho dos brotos formados *in vitro*, Naves et al. (2003) e Kurita (2011) obtiveram para a bromélia *Alcantarea imperialis*, melhores resultados no meio de cultura MS em sua formulação original, corroborando nossos resultados (Tabela 3; Figura 3).

Tabela 3 - Parâmetros qualitativos do comportamento das microcepas de *Neoregelia* sp em relação ao meio de cultura e tempo de cultivo *in vitro*

Meios/Subcultivo	Homogeneidade	Tamanho dos brotos	Vigor
MS			
30 dias	Homogênea	Menores	Ótimo
60 dias	Heterogênea	Médios	Ótimo
90 dias	Heterogênea	Maiores	Ótimo
120 dias	Heterogênea	Maiores	Ótimo
½ MS			
30 dias	Homogênea	Menores	Bom
60 dias	Homogênea	Menores	Bom
90 dias	Heterogênea	Médios	Bom
120 dias	Heterogênea	Médios	Bom
WPM			
30 dias	Homogênea	Menores	Bom
60 dias	Homogênea	Menores	Regular
90 dias	Homogênea	Menores	Regular
120 dias	Homogênea	Menores	Regular

Figura 3 - Desenvolvimento de brotações nas microcepas de *Neoregelia* sp nos meios de cultura de multiplicação MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM, suplementados com $0,050 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP com 4 subcultivos sucessivos (30 dias cada)

Apesar do meio de cultura MS ter desenvolvido os maiores brotos e estes serem os mais vigorosos, eles não foram homogêneos, ou seja, houve a ocorrência simultânea de brotos maiores, médios e menores. Fato este não foi observado nos explantes mantidos no meio de cultura WPM, onde se desenvolveram os menores e menos vigorosos brotos, mas de forma homogênea, todos apresentaram praticamente o mesmo tamanho, o que pode representar uma vantagem, na dependência da finalidade do cultivo *in vitro*.

A diferença observada nos parâmetros qualitativos das microcepas corroborou com as análises de variância do peso da matéria fresca e da matéria seca, as quais revelaram que houve diferença para o peso da matéria fresca apenas em relação ao meio de cultura MS, que apresentou os maiores valores, bem como para o peso da matéria seca, a qual evidenciou diferença entre os meios de cultura MS e WPM, não diferindo, porém, em relação ao meio $\frac{1}{2}$ MS, que apresentou valores intermediários (Tabela 4; Figura 4).

Tabela 4 - Resultados da análise de variância do peso da matéria fresca e da matéria seca de brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM)

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrados	
		Matéria fresca (g)	Matéria seca (g)
Tratamento	2	5,29*	0,002*
Resíduo	72	0,64	0,001
Média	-	1,16	0,09
CV (%)	-	68,97	35,14

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Figura 4 - Valores médios do peso da matéria fresca e da matéria seca de brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre a 5% de probabilidade pelo teste Tukey

Embora a diluição do meio MS envolva, além do nitrogênio, o decréscimo da concentração de outros nutrientes, Kanashiro (2005) verificou que esse nutriente é o principal fator limitante para o crescimento das bromélias. Nesse sentido, o meio de cultura MS possui maior disponibilidade de nitrogênio dos três meios de cultura testados, e valores elevados de fontes nitrogenadas como os encontrados no meio MS induzem a uma maior produção de metabólitos acarretando no crescimento das brotações, tamanho das folhas e consequente incremento do peso de matéria fresca e seca das microcepas.

Os resultados obtidos corroboram os apresentados nos estudos realizados por Bellintani et al. (2007) e Tamaki et al. (2007), onde não foi observado diferença significativa na análise do peso de matéria seca de *N. mucugensis* e *Ananas comosus* cultivar “Smooth Cayenne”, respectivamente, mantidos em meio de cultura MS e ½ MS sem suplementação de reguladores de crescimento.

Outro parâmetro relevante é a taxa de crescimento, que mesmo sendo geneticamente determinado, o microambiente químico e físico proporcionado pelo cultivo *in vitro*, como

disponibilidade de nutrientes, reguladores de crescimento, luminosidade controlada, podem acarretar diferenças no desenvolvimento (CASANOVA et al., 2008), conforme evidenciam os resultados do presente trabalho com relação aos meios de cultura utilizados, onde observou-se uma maior taxa de crescimento relativo para as microcepas mantidas em meio de cultura MS, seguidos pelos meios ½ MS e WPM (Tabela 5).

Tabela 5 - Taxa de crescimento relativo (%) da produção de matéria seca em brotações de *Neoregelia* sp na multiplicação *in vitro* nos meios de cultura MS, ½ MS e WPM

Meio de cultura	R%
	<i>Neoregelia</i> sp
MS	0,39
½ MS	0,14
WPM	0,01

A maior taxa de crescimento relativo verificada no tratamento com o meio de cultura MS apoia os resultados observados para os parâmetros qualitativos (Tabela 3; Figura 3) e deve-se principalmente à maior disponibilidade de fontes nitrogenadas nesse meio de cultura conforme discutido anteriormente.

5.1.2 Análise do nitrogênio total e fracionado

Os resultados obtidos para a análise de variância do nitrogênio total evidenciaram diferença apenas para o meio de cultura MS (Tabela 6; Figura 5), que apresenta maior disponibilidade de fontes nitrogenadas em relação aos meios de cultura ½ MS e WPM (Tabela 7).

Tabela 6 - Resultados da análise de variância para o teor de nitrogênio total das brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM)

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrados
		N (g/kg)
Tratamento	1	233,91*
Resíduo	2	8,65
Média	-	29,91
CV (%)	-	9,83

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Figura 5 - Valores médios para os teores de nitrogênio total em brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, 1/2 MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey

Tabela 7 - Comparação quanto a disponibilidade de fontes nitrogenadas entre os meios de cultura MS, 1/2 MS e WPM

mg.L ⁻¹			
Nutrientes	MS	1/2 MS	WPM
NH ₄ ⁺	288,606	144,303	69,965
NO ₃ ⁻	551,686	275,843	135,889

Nossos resultados são suportados e estão de acordo com o estudo de Kurita (2011), onde o autor constatou que para a bromélia *Alcantarea imperialis*, o incremento de nitrogênio no meio de cultura promove o aumento endógeno deste elemento, sendo observado o maior acúmulo no meio de cultura MS.

A análise de variância para o teor de nitrogênio amoniacal não diferiu entre os tratamentos (Tabela 8; Figura 6). Este resultado está provavelmente relacionado ao próprio metabolismo no nitrogênio em plantas, visto que o acúmulo do íon amônio (NH₄⁺) é prejudicial à fisiologia do vegetal, podendo levar a morte, sendo rapidamente assimilado na forma orgânica (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Tabela 8 - Resultados da análise de variância para os teores de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) nas brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM)

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrados
		(N-NH_4^+) (g.kg^{-1})
Tratamento	1	0,0639 ^{ns}
Resíduo	2	0,0034
Média	-	0,2858
CV (%)	-	20,40

^{ns} não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Figura 6 - Valores médios para os teores de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) em brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey

Por outro lado, em relação à análise de variância do teor de nitrogênio nítrico, houve diferença em relação ao meio de cultura WPM (Tabela 9; Figura 7), que apresentou o menor valor, o que se justifica pela menor disponibilidade desse nutriente em sua formulação (Tabela 7).

Tamaki et al. (2007) observou que explantes de *Ananas comosus* mantidos em diferentes diluições de macronutrientes do meio MS, apresentaram maior teor de nitrato nos explantes cultivados em meio de cultura MS e decrescendo cerca de 50% no meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, o que não foi verificado em nosso trabalho, visto que os explantes mantidos em meio de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS não apresentaram diferença no teor de nitrato.

Tabela 9 - Resultados da análise de variância para os teores de nitrogênio nítrico (N-NO_3^-) nas brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM)

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrados
		(N-NO_3^-) (g. kg^{-1})
Tratamento	1	3,2400*
Resíduo	2	0,5158
Média	-	1,7553
CV (%)	-	40,92

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Figura 7 - Valores médios para os teores de nitrogênio nítrico (N-NO_3^-) nas brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos com 30 dias de duração cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey

Os dados obtidos para a análise de variância do teor de nitrogênio proteico apresentaram diferença entre os três tratamentos analisados, sendo que os valores corresponderam à concentração de nitrogênio disponível no meio de cultura, ou seja, o maior valor foi observado nas microcepas mantidas em meio de cultura MS, seguido pelo $\frac{1}{2}$ MS e WPM com os menores valores (Tabela 10; Figura 8).

Tabela 10 - Resultados da análise de variância dos teores de nitrogênio proteico nas brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM)

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrados
		Nitrogênio proteico (g.kg ⁻¹)
Tratamento	1	240,48*
Resíduo	2	5,054
Média	-	27,16
CV (%)	-	8,28

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Figura 8 - Valores médios para os teores de nitrogênio protéico nas brotações de *Neoregelia* sp ao final de 4 subcultivos sucessivos, com duração de 30 dias cada, em função dos meios de cultura de multiplicação (MS, ½ MS e WPM). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey

Dessa forma, apesar da análise de nitrogênio nítrico não ter apresentado diferença entre os meios de cultura MS e ½ MS (Tabela 9; Figura 7), a análise de nitrogênio proteico revelou que a maior disponibilidade de fontes nitrogenadas no meio MS possibilitou maior metabolismo nas vias de formação de proteínas, elevando o acúmulo das mesmas.

Em consideração a todos os parâmetros analisados durante a condução do experimento de multiplicação a partir de brotações de microcepas nos meios de cultura avaliados, observou-se que o meio de cultura MS promoveu maior crescimento dos brotos, obtendo os valores mais elevados de peso de matéria fresca e seca, além da maior taxa de crescimento relativo. Os brotos desenvolvidos em meio de cultura MS se mostraram muito vigorosos, corroborando com as análises de nitrogênio total e fracionado, onde observou-se a maior produção de proteínas em relação às brotações desenvolvidas nos outros meios de cultura testados (½ MS e WPM) (Tabela 3; Figura 3 e Tabela 10; Figura 8).

No entanto, os meios de cultura $\frac{1}{2}$ MS e WPM promoveram uma taxa de multiplicação semelhante a do MS, mas com brotos menores e menos vigorosos, porém mais homogêneos (Tabela 3; Figura 3). Dessa forma, salienta-se que dependendo do objetivo do cultivo *in vitro*, os meios de cultura $\frac{1}{2}$ MS e WPM não devem ser desconsiderados, a exemplo do estabelecimento de um banco de germoplasma, no qual esses meios de cultura podem ser uma boa alternativa para a manutenção do cultivo *in vitro*, sem prejudicar o seu desenvolvimento.

5.1.3 Aclimatização das brotações das microcepas

A análise de sobrevivência somente constatou a morte de três microplantas oriundas do meio de cultura WPM aos 30 dias, não registrando mais nenhuma morte aos 60, 90 e 120 dias. Segundo Aranda-Peres e Rodrigues (2006), a família Bromeliaceae é formada por espécies rústicas, e com isso, apresentam elevadas taxas de sobrevivência durante o processo de aclimatização.

Os dados obtidos evidenciam que tanto o tamanho da microplanta (Figura 9A), quanto o substrato utilizado foram satisfatórios para o sucesso no processo de aclimatização (Figura 9B). Carneiro (1997) e Ferreira et al. (2007) também obtiveram seus melhores resultados utilizando Plantmax® durante a aclimatização de espécies de bromélias.

Figura 9 - Microplanta utilizada para aclimatização (A). Bandeja de tubetes com as microplantas durante o processo de aclimatização (B)

Cabe ressaltar que no meio de cultura os nutrientes estão disponíveis em formas de fácil absorção, com isso o metabolismo das microplantas é sobretudo heterotófico. Caracterizando dessa forma, a importância do processo de aclimatização, pois é quando

ocorre o estímulo para a retomada da função metabólica autotrófica original da microplanta (KOZAI, 1991).

Portanto, a escolha do tamanho da microplanta e do tipo de substrato utilizados, mostraram-se essenciais para a sobrevivência das mesmas, pois nos primeiros meses de aclimatização as microplantas passam por um aumento significativo de atividade metabólica, com consequente aumento de absorção dos nutrientes contidos no substrato (FERREIRA et al., 2007).

5.2 Multiplicação a partir de explantes foliares

5.2.1 Análises morfofisiológicas

A formação de brotos nos explantes foliares somente ocorreu no material mantido nos meios de cultura MS e ½ MS, sendo que os explantes cultivados em meio de cultura WPM, além de não formarem nenhum broto, iniciaram processo de senescência a partir do segundo subcultivo, sendo descartados a partir do terceiro (Figura 10).

No primeiro subcultivo não houve diferença no desenvolvimento de brotos nos explantes mantidos nos meios de cultura MS e ½ MS. No segundo, terceiro e quarto subcultivos ocorreu um aumento no número médio de brotos, mas ainda sem diferença significativa, e ao final do quarto subcultivo os explantes mantidos em meio MS apresentaram a média de cinco brotos (Figura 11A), enquanto os oriundos do meio ½ MS a média de quatro brotos por explante (Figura 11B).

Figura 10 - Desenvolvimento de propágulos em explantes foliares de *Neoregelia* sp nos meios de cultura de multiplicação MS, 1/2 MS e WPM, suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ de ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP com 4 subcultivos sucessivos (30 dias cada)

Figura 11 - Valores médios do número de brotações (NB) a partir de explantes foliares de *Neoregelia* sp ao longo de 4 subcultivos sucessivos (30 dias) em função dos meios de cultura de multiplicação MS (A), 1/2 MS (B) suplementados com 0,050 mg.L⁻¹ de ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP

Dessa forma, dentre os três meios de cultura testados (MS, 1/2 MS e WPM), apenas os meios de cultura MS e 1/2 MS resultaram no desenvolvimento de brotos a partir de explantes foliares no decorrer dos 120 dias de cultura *in vitro*, diferentemente do que ocorreu no mesmo experimento, porém, utilizando brotações como explantes (item 5.1).

Kanashiro et al. (2007) e Grossi (2000), observaram que microplantas de *Achemea blanchetiana* e *A. nudicaulis* respectivamente, cultivadas em meios de cultura com uma maior concentração de nitrogênio, apresentavam maior número de folhas em relação as microplantas cultivadas em meios de cultura pobres nesse nutriente. Isso provavelmente se deve, à manutenção das folhas mais velhas por um maior período tempo nas microplantas, diferentemente daquelas cultivadas em meios de cultura com baixa disponibilidade de nitrogênio, que devido à necessidade metabólica, mobilizam para as folhas mais novas o nitrogênio das folhas mais velhas, conduzindo-as à senescência (EPSTEIN; BLOOM, 2006; KANASHIRO et al., 2007).

A Figura 10 ilustra essa discussão supracitada, onde se pode observar que o explante foliar mantido no meio de cultura MS, mantém a coloração verde intensa durante todo o período de cultivo, porém, alguns explantes que se desenvolveram no meio de cultura ½ MS começam a apresentar no segundo subcultivo (60 dias) uma coloração amarelada, que se tornou muito evidente no quarto subcultivo (120 dias). Com relação aos explantes mantidos no meio de cultura WPM, a coloração amarelada é nítida já no segundo subcultivo (60 dias), evidenciando a mobilização do nitrogênio para o desenvolvimento de brotações, porém, sem sucesso. O mesmo não ocorreu no experimento utilizando brotações de microcepas como explantes, devido provavelmente a maior disponibilidade endógena de fontes nitrogenadas nas brotações, porém, vale ressaltar que as brotações desenvolvidas no meio de cultura WPM foram as menos vigorosas visualmente (Figura 3).

Não houve contaminação e nem manifestação bacteriana endofítica para os três meios de cultura avaliados (MS, ½ MS e WPM) durante todo período de cultivo. Entretanto, foi observada oxidação nos explantes mantidos em todos os meios de cultura testados, o que acarretou na a morte de alguns de forma indistinta em relação ao tratamento. De forma similar, Ferreira (2009) obteve sucesso no desenvolvimento de protuberâncias na extremidade proximal das folhas de *Ananas comosus*, seguida por oxidação e morte.

Durante o processo de aquisição da competência é necessária a reprogramação nos padrões de expressão gênica e também mudanças na morfologia, fisiologia e metabolismo do explante (NAMASIVAYAM, 2007). Durante o cultivo *in vitro*, diversos fatores atuam na indução deste processo, podendo ser agentes estressantes de natureza mecânica, como injúrias, física, como temperatura e luminosidade, ou química, utilizando altas concentrações de sais (CARVALHO et al., 2009). Segundo Potters et al. (2007), diferentes estresses abióticos podem induzir uma mistura de ativação e inibição do desenvolvimento, sendo que alterações no metabolismo de auxinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) são consideradas

sinalizadoras de respostas morfogênicas induzidas por estresse. As ROS induzem mudanças no padrão de expressão gênica e no metabolismo celular, estas mudanças são essenciais para a aquisição de competência em células somáticas, dessa forma, certo nível de estresse oxidativo é necessário para desencadear uma rota morfogênica específica (BLAZQUEZ et al., 2009).

Lichtenthaler (1998) explica que a resposta fisiológica ao estresse é dependente de dois fatores, o estágio fisiológico das células do explante e o nível (tempo e intensidade) do estresse, pois quando o nível de estresse excede a tolerância celular, leva à morte das células, mas se o nível é tolerável, pode induzir mecanismos de adaptação. Nesse sentido, nossos resultados evidenciaram que alguns explantes não conseguiram tolerar o estresse, entrando em processo de senescência.

5.3 Monitoramento das vias morfogênicas em explantes foliares

5.3.1 Análise morfofisiológica

A análise morfofisiológica revelou o desenvolvimento de protuberância (Figura 12A) na região proximal dos explantes, assim como o desenvolvimento de raiz (Figura 12B) e em alguns explantes, o início do desenvolvimento de brotações (Figura 12C e D). Além disso, foi verificado que os explantes F1 apresentaram maior desenvolvimento de protuberância e/ou raiz em relação aos explantes F2 durante os 30 dias de cultivo *in vitro* (Figura 13B e C), provavelmente por apresentarem células mais jovens e menos diferenciadas. Porém, estudos com lenhosas, diferentemente do verificado neste experimento, mostram que há um gradiente de juvenilidade que se estabelece em direção à base da árvore (ZOBEL; TALBERT, 1984; ELDRIDGE et al., 1994).

Nesse contexto, Prado (2012) constatou mediante análise em MEV, que na região proximal de explantes foliares de *Vriesea friburgensis*, não são encontrados tricomas, diferentemente do observado nas demais regiões onde os tricomas são abundantes, o que levou o autor a relacionar essa região à presença de tecidos menos diferenciados e mais propícios a atividade morfogênica.

Figura 12 - Explantes foliares de *Neoregelia* sp mantidos em meio de cultura MS multiplicação. A - Protuberância da região proximal; B - Protuberância e presença de raiz; C - Protuberância e primórdio foliar e D - Protuberância, primórdio foliar e raiz. P = protuberância; R = raiz; PF = primórdio foliar

Figura 13 - Número de explantes foliares de *Neoregelia* sp com desenvolvimento de protuberância e raiz em 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS de multiplicação. A – Número total de explantes foliares responsivos; B – Número de explantes foliares F1 responsivos; C – Número de explantes foliares F2 responsivos

Além disso, a maior parte dos explantes F1 começaram a apresentar resposta morfogênica aos 15 dias de cultivo (Figura 13B), porém, registrou-se resposta morfogênica em todas as datas de avaliação. O desenvolvimento de estruturas semelhantes foi observado para a espécie *Neoregelia cruenta* (CARNEIRO et al., 1999), após o cultivo *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com os reguladores de crescimento ANA (2,5 μ M) e BAP (22,0 μ M). O mesmo foi observado em outras espécies da família Bromeliaceae como *Ananas comosus*, onde Soneji, Rao e Mhatre (2002) dividiram horizontalmente a lâmina foliar em três

regiões (proximal, mediana e distal) obtendo reposta morfogênica apenas na região proximal da lâmina foliar, com senescência das demais regiões.

Hosoki e Asahira (1980), propõem que o elevado potencial regenerativo da região proximal de explantes foliares é devido à presença de meristema intercalar axilar na região proximal das folhas de bromélias, visto que segundo Benzing (1980) as bromélias apresentam uma faixa de tecido embriogênico localizado na base de cada folha imatura responsável pelo desenvolvimento dos tecidos foliares.

Vale lembrar, que a natureza sésil das plantas as torna susceptíveis às variações e adversidades ambientais, impondo-lhes uma série de desafios à sobrevivência, porém, diferentemente dos animais, apresentam desenvolvimento aberto, ou seja, não possuem número de órgãos pré-definido, sendo que estes podem crescer e se desenvolver durante todo o período pós-embriônico, conferindo aos vegetais uma maior plasticidade de respostas às intempéries ambientais, tanto no nível fisiológico quanto morfológico (RODRIGUES; KERBAUY, 2009).

Nesse contexto, podemos relacionar a elevada capacidade de resposta morfogênica dos tecidos localizados na face adaxial da região proximal dos explantes foliares de Bromeliaceae, à necessidade de adaptação e propagação da espécie sob condições ambientais adversas, destacando que é nessa região, que ocorre a formação do “tanque” e consequentemente a absorção de água e nutrientes, além do desenvolvimento das gemas florais.

5.3.2 Análises histológicas e histoquímicas

As análises histológicas realizadas para o monitoramento do potencial e vias morfogênicas dos explantes foliares, evidenciaram que na região proximal do explante foliar recém-isolado da microplanta, não há células com atividade meristemática, porém, foi observada a presença de amiloplastos (Figura 14A). Ao passo que as análises realizadas a partir de cinco dias de cultivo em meio de cultura MS multiplicação, evidenciaram a presença de protuberâncias com origem a partir de divisões periclinais e anticlinais das células parenquimáticas localizadas no mesofilo da região proximal dos explantes foliares (Figura 14B). De forma semelhante, Alves, Dal Vesco e Guerra (2006) obtiveram o desenvolvimento de nódulos a partir de células do parênquima em explantes foliares de *Vriesea reitzii*, utilizando o meio de cultura MS suplementado com os reguladores de crescimento 2,4-D (20,0 mM) e Kin (1,0 mM), após três semanas de cultivo *in vitro*.

Figura 14 - Fotomicrografia de secções longitudinais de explantes foliares de *Neoregelia* sp. A – Região proximal do explante foliar recém-isolado da microplanta, evidenciando a região da injúria, a ausência de células em atividade meristemática e a presença de amiloplastos. B – Região proximal do explante foliar evidenciando o início da formação da protuberância com o desenvolvimento de meristemóides isolados por mucilagem (polissacarídeos) e a presença de compostos fenólicos. C – Região proximal do explante foliar com a presença de meristemóides isolados por mucilagem (polissacarídeos). D – Células parenquimáticas competentes à embriogênese somática observadas na região proximal do explante foliar. Am = Amiloplastos; Nc = Núcleo; N = Nucléolo; V = Vacúolo; setas pretas = região da injúria; setas amarelas = meristemóides; setas vermelhas = mucilagem (polissacarídeos); setas laranjas = compostos fenólicos; setas verdes = células parenquimáticas competentes à embriogênese somática isoladas por mucilagem (polissacarídeos). Figuras A, B e C: Barras = 100 μ m; Figura D: Barra = 20 μ m

Os cortes histológicos mostraram que as divisões periclinais e anticlinais deram origem à meristemóides envoltos por mucilagem (polissacarídeos) (Figura 14B e C) conforme o descrito também por Mercier et al. (2003), que observaram a formação de meristemóides provenientes da intensa divisão celular das células parenquimáticas de explantes foliares de *Ananas comosus* utilizando meio de cultura MS suplementado com ANA (27,0 μ M) e BAP (1,0 μ M). Além disso, foram observadas células competentes à embriogênese somática isoladas por mucilagem (Figura 14D), Graner (2013) ressalta que o isolamento entre as células vizinhas favorece a reprogramação de funções genômicas e celulares, eventos

fundamentais para a aquisição de competência à totipotencialidade, e ainda segundo Verdeil et al. (2007), as células totipotentes apresentam núcleo volumoso, com um único nucléolo e elevada relação núcleo-citoplasma, a presença de eucromatina é predominante, o citoplasma é denso e raramente são observados plasmodesmos, dados estes que corroboram os observados em nossos resultados com as células embriogênicas.

A ausência de amiloplastos na região da protuberância, associado à presença de mucilagem (polissacarídeos) nos espaços intercelulares, durante o desenvolvimento dos meristemóides e das células competentes, revelam o uso dessas substâncias como recurso energético à indução e ao desenvolvimento inicial desses eventos (ALMEIDA et al., 2012; GRANER, 2013).

Além disso, intensa divisão celular foi observada em regiões próximas à injúria, formada pela retirada do explante foliar da microplanta, onde se verificou a presença de compostos fenólicos (Figura 14B). Na literatura, os compostos fenólicos veem sendo relacionados ao processo de desdiferenciação celular e aos primeiros estádios de indução e diferenciação para embriogênese somática (ALEMANNO et al., 2003; ALMEIDA et al., 2012). Nesse contexto, Kouakou et al. (2007), disseram que a embriogênese somática é influenciada pela produção de compostos fenólicos e estes podem servir como marcadores desta via morfogênica em *Gossypium hirsutum* L., visto que durante os subcultivos dessa espécie e utilizando duas cultivares (embriogênica e não-embriogênica), a quantidade de compostos fenólicos aumentou na cultivar embriogênica, enquanto que na cultivar não-embriogênica o conteúdo desses compostos diminuiu.

Nesse contexto, os compostos fenólicos podem promover um aumento nos níveis endógenos de auxinas, uma vez que podem atuar como inibidor da enzima AIA oxidase, e aumentar consequentemente a indução de eventos morfogênicos, principalmente a embriogênese somática (WILSON; STADEN, 1990; HAUSMAN, 1993; ALMEIDA et al., 2012).

Os cortes histológicos da região distal do explante foliar mostraram a presença de células em processo de morte celular e de amiloplastos em processo degenerativo (Figura 15A). Por outro lado, os cortes histológicos da região mediana não apresentaram células em processo de morte celular e a presença de amiloplastos foi menor, porém, detectou-se células em divisão celular (Figura 15B).

Figura 15 - Fotomicrografia de seções longitudinais de explantes foliares de *Neoregelia* sp. A – Região distal do explante foliar com muitos amiloplastos e células em processo de morte celular. B – Região mediana do explante foliar apresentando elevado consumo de amido. Am = Amiloplastos; setas pretas = células em processo de morte celular; setas amarelas = células em divisão celular. Barras = 100 µm

Provavelmente, as células observadas em processo de morte celular e degeneração de amido, estão relacionadas ao consumo e/ou remobilização de nutrientes para o desenvolvimento dos eventos morfogênicos, conforme o relato de Munné-Bosh (2007) onde cita que a morte celular além de ocorrer devido a senescência, é um processo fisiológico regulado, que permite a remobilização de nutrientes. De modo geral, a presença de amido está relacionada à organogênese e à embriogênese somática, pois é essa substância que fornece energia durante os processos morfogênicos (THORPE et al., 1986; FORTE; PAIS, 2000). Nossos resultados corroboram com Ferreira (2009) que observou o desenvolvimento acelerado de nódulos em explantes foliares de *A. comosus*, com lise gradativa das células do mesofilo e da camada epidérmica.

As análises histológicas revelaram também que houve a formação de gemas adventícias a partir de células parenquimáticas da protuberância formada na região proximal de explantes foliares de *Neoregelia* sp (Figura 16A e B). Carneiro et al. (1999) obteve o desenvolvimento de gemas adventícias na região proximal de explantes foliares de *N. cruenta* após três e quatro semanas do início do cultivo *in vitro*. O desenvolvimento de gemas adventícias a partir da região da protuberância foi obtido em outras espécies de Bromeliaceae como *V. fosteriana*, após quatro semanas de cultivo *in vitro* (MERCIER; KERBAUY, 1992), *Dyckia macedoi* (MERCIER; KERBAUY, 1993) e Sripaoraya et al. (2003), *A. comosus* (SRIPAORAYA et al., 2003).

Nos últimos anos, diversas pesquisas tem utilizado explantes foliares de diferentes espécies de bromélias para o estabelecimento de culturas nodulares, que segundo Scherer et

al. (2013) são definidos como nódulos organogênicos globulares, que apresentam coloração de amarelo-esverdeado a translúcido, com textura variando de friável a ligeiramente compacta, apresentando “clusters” meristemáticos, que em condições adequadas, podem regenerar múltiplos brotos (RECH FILHO et al., 2005, 2009; ALVES et al., 2006; DAL VESCO; GUERRA, 2010; GUERRA; DAL VESCO, 2010; DAL VESCO et al., 2011). Porém, os resultados deste experimento evidenciaram a formação de protuberâncias que segundo a descrição de Scherer et al. (2013) não se caracterizam como nódulos organogênicos globulares, seriam melhor descritas como um rearranjo tecidual de células competentes.

As desvantagens que se observam no uso de culturas nodulares para a micropropagação de espécies de bromélias são: as altas concentrações de reguladores de crescimento utilizadas para a formação dos nódulos e posterior troca de tratamento para a regeneração dos brotos. Utilizando-se concentrações inferiores de reguladores de crescimento, pode-se conseguir regenerar brotos diretamente da protuberância, sem a formação dos nódulos, o que é vantajoso pelo menor tempo de cultivo *in vitro*, e consequente menor uso de reagentes.

Além da presença das gemas adventícias também se verificou a presença de pró-embriões, isolados por mucilagem (polissacarídeos), originados de divisões assimétricas de células parenquimáticas da mesma protuberância que originou as gemas adventícias, pelo processo de desdiferenciação, ressaltamos que essas células apresentam citoplasma denso, com elevado conteúdo protéico, vacúolos pequenos e nucléolo evidente (Figura 16C e D), características estas, destacadas por Almeida et al. (2012) como forte indicativo de células com elevada capacidade de divisão e competência embriogênica. Ressalta-se que estas células podem atuar como células-tronco, permanecendo inativas e sendo protegidas por células vizinhas, de forma a gerar um “nicho de sobrevivência”, que diante de alguma situação adversa, poderiam reassumir a totipotência e originar os embriões somáticos, ou na dependência do estímulo (estresse) a pluripotência, formando gemas adventícias.

Figura 16 - Fotomicrografias de secções paradérmicas da região proximal de explantes foliares de *Neoregelia* sp. A – Explante foliar original e região da protuberância evidenciando o desenvolvimento de gemas adventícias; B – Detalhe das gemas adventícias observadas em A; C e D – Pró-embriões, isolados por mucilagem (polissacarídeos), com origem unicelular a partir da dediferenciação de células parenquimáticas localizadas na região da protuberância. Destaque à presença de citoplasma denso, com elevado conteúdo protéico, vacúolos pequenos e nucléolo evidente. Rp = Região proximal do explante foliar; Mga = Meristema da gema adventícia; Pf = Primórdios foliares; asterisco preto = protuberância; setas verdes = gemas adventícias; setas azuis = traços de cordões de células procambiais; setas vermelhas = mucilagem (polissacarídeos); círculo vermelho = pró-embrião; N = nucléolo; V = vacúolo. Figuras A e B: Barras = 500 µm; Figuras C e D: Barras = 50 µm

Outro evento diagnosticado foi o desenvolvimento de raízes, também obtido por Scherer et al. (2013) com o desenvolvimento de raízes em explantes foliares de *A. comosus* cultivados em meio de cultura MS suplementado apenas por ANA (2,0 µM). As análises histológicas mostraram que o desenvolvimento de raízes, ocorreu a partir de duas origens: células parenquimáticas no mesofilo da região proximal do explante foliar (Figura 17A), ou das células parenquimáticas da protuberância (Figura 17B e C). Além disso, as raízes desenvolvidas não apresentaram anormalidades anatômicas, apresentando o cilindro vascular característico no centro da estrutura (Figura 17D).

Figura 17 - Fotomicrografias de explantes foliares de *Neoregelia* sp. A – Região proximal do explante foliar com o desenvolvimento de raízes adventícias; B – Raiz adventícia em corte longitudinal; C – Raiz adventícia; D – Raiz adventícia em corte transversal. Rp = Região proximal do explante foliar; Mar = Meristema apical radicular; Pr = Procâmbio; CV = cilindro vascular; PRd = Pêlos radiculares; asterisco preto: protuberância; seta amarela = raiz adventícia em secção longitudinal. Figura A: Barra = 500 μ m; Figura B e C e D: Barras = 100 μ m

Os cortes histológicos evidenciaram a ocorrência de gemas adventícias associadas à presença de raízes na região da protuberância ligada ao explante original, porém, sem conexão vascular entre as gemas adventícias e raízes, o que descarta a possibilidade de serem embriões somáticos (Figura 18A e B).

Figura 18 - Fotomicrografias de secções paradérmicas da região proximal de explantes foliares de *Neoregelia* sp. A e B – Gemas e raízes adventícias desenvolvidas na protuberância; Rp = Região proximal do explante foliar; Mga = Meristema da gema adventícia; Mar = Meristema apical radicular; Pr = Procâmbio; Pf = Primórdios foliares; asteriscos brancos e pretos = protuberância; setas verdes = gemas adventícias; setas amarelas = raízes adventícias. Figuras A e B: Barras = 500 μ m

Outro evento morfogênico diagnosticado nas análises histológicas foi a embriogênese somática de origem unicelular a partir da dediferenciação e de células parenquimáticas da protuberância (Figura 19A e B). Sripaoraya et al. (2003), obteve a partir da região proximal de explantes foliares de *A. comosus*, tanto o desenvolvimento de gemas adventícias, quanto o de calos embriogênicos dependendo dos reguladores de crescimento utilizados e do balanço entre eles. Os autores destacam ainda, que quando os explantes foliares foram cultivados em meio de cultura MS suplementado com 2,4D ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e BAP ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) obteve-se a formação de gemas adventícias, porém, calos embriogênicos desenvolveram-se quando os explantes foram mantidos em meio de cultura MS suplementado com picloram ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$).

Figura 19 - Fotomicrografias de secções paradermicas da região proximal de explantes foliares de *Neoregelia* sp. A – Embrião somático de origem unicelular a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas localizadas na protuberância; B – Detalhe do embrião somático observado em A. Rp = Região proximal do explante foliar; Zm = Zona meristemática. Figuras A: Barra = 20 μm ; Figura B: Barra = 50 μm

Dessa forma, as análises histológicas e histoquímicas realizadas para o monitoramento do potencial e das vias morfogênicas dos explantes foliares, evidenciaram que o uso do meio de cultura MS suplementado com os reguladores de crescimento ANA (0,05 mg.L^{-1}) e BAP (0,5 mg.L^{-1}) foi adequado, de modo que as células manifestaram sua capacidade organogênica e/ou embriogênica, sem a necessidade de choques auxínicos, o que normalmente leva à formação de calo, frequentemente associado à ocorrência de variação somaclonal (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006).

Com isso, obtivemos o desenvolvimento direto de gemas adventícias, raízes adventícias e embriões somáticos com origem unicelular. Pode-se dizer que as células parenquimáticas do mesofilo foliar localizadas na região proximal, atuaram como nichos de células-tronco em diferentes vias morfogênicas: pluripotentes, quando do desenvolvimento de gemas adventícias e/ou raízes (organogênese) e totipotentes quando observado o desenvolvimento de embriões somáticos (ALMEIDA et al., 2012; GRANER, 2013).

6 CONCLUSÕES

Para o uso de brotações de microcepas como explantes, os três meios de cultura de multiplicação testados (MS, ½ MS e WPM), bem como as concentrações fixas e combinadas de reguladores de crescimento, resultaram no desenvolvimento de índices considerados satisfatórios à formação de brotos por explante, no decorrer da cultura *in vitro* e, destacando que o uso de concentrações reduzidas de reguladores de crescimento, minimiza a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal.

As análises de nitrogênio total e fracionado permitiram a compreensão do uso das fontes nitrogenadas disponíveis nos meios de cultura MS, ½ MS e WPM, visto que os explantes mantidos em meio de cultura MS apresentaram valores mais elevados de nitrogênio total e proteico, levando a diferenças principalmente no vigor das brotações, porém, sem diferenças em relação às repostas morfogênicas.

Sugerimos a utilização alternada de meios de cultura (MS e WPM) entre as sucessivas transferências durante a fase de multiplicação, visando atender as necessidades nutricionais e da indução das vias morfogênicas.

O uso de explantes foliares de *Neoregelia* sp cultivadas *in vitro* mostrou-se como uma importante ferramenta para o aprimoramento de protocolos de regeneração da espécie, visto que na base adaxial das lâminas foliares, onde ocorre a formação dos “tanques” foram identificadas células parenquimáticas com capacidade morfogênica para totipotência ou pluripotência, capazes de originar embriões somáticos e gemas adventícias, atuando como células tronco em resposta a estímulos *in vitro* que corresponderiam a possíveis estresses da natureza, aumentando a capacidade de sobrevivência da espécie.

REFERÊNCIAS

- ALEMANN, L.; RAMOS, T.; GARGADENEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, n. 4, p. 613-623, 2003.
- ALMEIDA, L.V. **Técnicas para a otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hoog) K.D.Hill & L.A.S.Johnson.** 2012. 107 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration from pejiabaye adult plant leaf primordia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1449-1452, 2006.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V.; GRANER, E.M.; BRONDANI, G.E.; ABREU-TARAZI, M.F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.
- ALVES, G.M.; DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, p. 204-207, 2006.
- ANDRADE, F.S.A.; DEMATTÊ, M.E.S.P. Estudo sobre a produção e comercialização de bromélias nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 97-110, 1999.
- ARANDA-PEREZ, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. Bromeliads. In: SILVA, J.A.T. (Org.). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**. Tokyo: Global Science Books, 2006. v. 4, p. 644-655.
- BELLINTANI, M.C. **Estudo da propagação *in vitro* e *ex vitro* de *Neoregelia mucugensis* Leme, *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição e *O. albopictum* Philcox. Espécies de Bromeliaceae endêmicas da Bahia.** 2006. 123 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.
- BELLINTANI, M.C.; LIMA, C.C.; BRITO, A.L.; SANTANA, J.R.F.; DORNELLES, A.L.C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1101-1103, 2007.
- BENCKE, M.; DROSTE, A. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich. (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas Botânicas**, São Leopoldo, n. 59, p. 299-306, 2008.
- BENNETT, B.C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZING, D.H. (Ed.). **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 587-608.

BENZING, D.H.; RENFROW, A. The nutritional dynamics of *Tillandsia circinnata* in Southern Florida and the origin of the “air plant” strategy. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 141, n. 2, p. 165-172, 1980.

BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, p. 49-57, 2009.

BURR, K.E.; TINUS, R.W. Use of clones increases the power of physiological experiments on coastal Douglas-fir. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 96, p. 458-466, 1996.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 37-64.

CANTO, A.M.M.E.; SOUZA, F.V.D.; COSTA, M.A.C.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; CABRAL, J.R.S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

CARNEIRO, L.A. **Controle da morfogênese in vitro de três espécies de bromélias endêmicas do sudeste brasileiro**. 1997. 87 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura de “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, C.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J. In vitro regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham). L. B. Smith, an endemic bromeliad from eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, p.79-83, 1999.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; CAMARA, T.R. **Mecanismos antioxidativos associados à embriogênese somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. 25 p. (Documentos, 223).

CASANOVA, E.; MOYSSET, L.; TRILLAS, M.I. Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2008.

COXSON, D.S.; NADKARNI, N.M. **Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest ecosystems**. San Diego: Academic Press, 1995. 545 p.

DAL VESCO, L.L. **Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da Mata Atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): bases para a conservação e propagação massal**. 2010. 91 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 125, p. 748-755, 2010.

DAL VESCO, L.L.; STEFENON, V.M.; WELTER, L.J.; SCHERER, R.F.; GUERRA, M.P. Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, p. 515–522, 2011.

De SMET, I.; BEECKMAN, T. Asymetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. **Nature Reviews – Molecular Cell Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 177-188, 2011.

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

DROSTE, A.; SILVA, A.M.; MATOS, A.V.; ALMEIDA, J.W. In vitro culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; VanWYK, G. Eucalypt domestication and breeding. Oxford: Clarendon Press, 1994. 288 p.

ENDRES, L.; MERCIER, H. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 1, p. 29-42, 2001.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. 2. ed. Londrina: Ed. Planta, 2006. 403 p.

FERREIRA, C.A.; PAIVA, P.D.O.; RODRIGUES, T.M.; RAMOS, D.P.; CARVALHO, J.G.; PAIVA, R. Desenvolvimento de mudas de bromélia (*Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith) cultivadas em diferentes substratos e adubação foliar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 666-671, 2007.

FERREIRA, J.M.G. **Caracterização anatômica de processos regenerativos em *Ananas comosus* var. *comosus* cv. Pérola**. 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

FIROOZABADY, E.; MOY, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 40, p. 67–74, 2004.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, Berlin, v. 16, p. 92-96, 1968.

FORTES, A.M.; PAIS, M.S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabaceae): histological studies and changes in the starch content. **American Journal of Botany**, Palo Alto, v. 87, n. 7, p. 971-979, 2000.

FRÁGUAS, C.B.; DORNELLES, C.M.V.; LIMA, G.P.P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar ‘IAC Gomo-de-mel’. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1682-1687, 2009.

GAHAN, P.B.; GEORGE, E.F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. de. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 355-401.

GALVANESE, M.S.; TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P.; STANCATO, G.C.; HARDER, I.C.F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Ceres**, São Paulo, v. 54, n. 311, p. 63-67, 2007.

GRANER, E.M. **Avaliação histocitológica, histoquímica e morfofisiológica da habituação e senescência em pupunheiras mantidas “in vitro”**. 2013. 197 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura de “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABC; EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 99-169.

GREEN, P.B. Organogenesis: a biophysical view. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.31, p.51-82, 1980.

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

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L. Strategies for the micropropagation of bromeliads. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants**. Berlin: Springer, 2010. p. 47-66. (Methods in Molecular Biology, 589).

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, 1999.

GUEYE, B.; SAID-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; HILBERT, J.L.; VERDEIL, J.L.; BLERVACQ, A.S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 1, p. 47–58, 2009.

HAMASAKI, R.M.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated in vitro. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 4, p. 383-389, 2005.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 203-212.

HAUSMAN, J.F. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 1, n. 36, p. 27-33, 1994.

HICKS, G.S. Patterns of organ development in plant: tissue culture and the problem of organ determination. **The Botanical Review**, New York, v. 46, p. 1-23, 1980.

HOCHEDLINGER, K.; PLATH, K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 509-523, 2009.

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience**, St. Joseph, v. 15, p. 603-604, 1980.

HUANG, P.L.; LIAO, L.J.; TSAI, C.C.; LIU, Z.H. Plant micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 130, p. 894-898, 2010.

HUSSAIN, A.; QARSHI, I.A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. Plant tissue culture: current status and opportunities. In: LEVA, A.; RINALDI, L.M.R. **Recent advances in plant in vitro culture**. Rijeka: InTech, 2012. p. 1-28.

INSELSBACHER, E.; CAMBUI, C.A.; RICHTER, A.; STANGE, C. F.; MERCIER, H. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 175, p. 311-320, 2007.

JONES, J.B.; MURASHIGE, T. Tissue propagation of *Aechmea fasciata* and other bromeliads. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Bellefonte, n. 24, p. 117-126, 1974.

KANASHIRO, S. Nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. SMITH *in vitro*. 2005. 187 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R.C.S.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

KARNOVSKY, M.J.A. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CBA, 1999. v. 2, p. 519-531.

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

KOUAKOU, T.H.; WAFFO-TÉGUO, P.; KOUADIO, Y.J.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DECENDIT, A.; MÉRILLON, J.M. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, p. 25-29, 2007.

KOZAI, T. Acclimatization of micropropagated plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p. 127-141. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 17).

KURITA, F.M.K. **Crescimento in vitro da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio**. 2011. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures of plants improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.

LICHTENTHALER, H.K. The stress concept in plants: an introduction. **New York Academy of Sciences**, New York, v. 851, p. 187-198, 1998.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Calisle, v. 30, p. 421-427, 1980.

LUTHER, H.E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 13th ed. Sarasota: Marie Selby Botanical Gardens, 2012. 114 p.

MAJEROWICZ, N. Fotossíntese. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 114-178.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. Técnicas de cultura de tecidos. In: _____. (Ed.). **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-181.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London, Academic Press, 1995. 889 p.

MARTIN, C.E. Physiological ecology of the Bromeliaceae. **The Botanical Review**, New York, v. 60, p. 1-82, 1994.

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

MATHEWS, V.H.; RAO, P.S. In vitro plant regeneration in lateral bud explants of *Cryptanthus bromelioides* var. *tricolor* M. B. Foster. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 1, p. 108-110, 1992.

MEKERS, O. In vitro propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 78, p. 311-317, 1977.

MENGARDA, L.H.G.; POVOAS, L.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 6, p. 469-474, 2009.

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

_____. Micropropagation of *Dyckia macedoi* an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation**, Kew, v. 1, p. 70-72, 1993.

_____. The importance of tissue technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic Rain Forest canopy. **Selbyana**, Sarasota, v. 16, p. 147-149, 1995.

_____. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAY, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, 1997. p. 43-57.

_____. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, n. 3, p. 225-228, 1998.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E. Effects of NO_3^- , NH_4^+ and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 20, p. 387-392, 1997.

MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves on pineapple culture *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 15, n. 2, p. 107-112, 2003.

MUNNÉ-BOSCH, S. Aging in perennials. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 123-138, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, p. 1-8, 2007.

NAVES, V.C.; PAIVA, P.D.; PAIVA, R.; PASQUAL, M.; PAIVA, L.V. Avaliação de diferentes concentrações dos meios de cultura MS e Knudson para propagação *in vitro* da bromélia-imperial. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 161-166, 2003.

NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 9, p. 1387-1398, 2001.

OSBORNE, D.J.; MCMANUS, M.T. **Hormones, signals and target cells in plant development**. New York: Cambridge University Press, 2005. 268 p.

PARDO, A.; MICHELANGELI, C.; MOGOLLÓN, N.; ALVARADO, G. Regeneración in vitro de *Billbergia Rosea* Hortus Ex Beer a partir de ápices caulinares. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas**, Maracaibo, v. 42, n. 4, p. 491–505, 2008.

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

PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; HENDRIKS, J. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of in vitro cultivated seedling of Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 24, p. 193-199, 1984.

POTTERS, G.; PASTERNAK, T.P.; GUISEZ, Y.; PALME, K.J.; JANSENEMAIL, M.K.A. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, p. 98-105, 2007.

PRADO, J.P.C. **Caracterização morfo-histoquímica da germinação e o desenvolvimento pós-seminal in vitro e formação de culturas nodulares em *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith e *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa.** 2012. 103 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

PREECE, J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.-J. de. (Ed). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 403-422.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 38, p. 115-124, 2002.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from Atlantic forest. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 909-912, 2009.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L.L.; NODARI, R.O.; LISCHKA, R.W.; MÜLLER, C.V.; GUERRA, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 14, p. 1799–1808, 2005.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, Berlin, v. 249, n. 3, p. 747-748, 2011.

RODRIGUES, M.A.; KERBAUY, G.B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 525-549, 2009.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.

SATHYANARAYANA, B.N.; BLAKE, J. The effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on in vitro rooting of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). In: LUMSDEN, P.J.; NICHOLAS, J.R.; DAVIES, W.J. (Ed.). **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 77-82.

SCHEIBLE, W.R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E.D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v. 11, p. 671-691, 1997a.

SCHEIBLE, W.R.; GONZALEZ-FONTES, A.; LAUERER, M.; MULLER-ROBER, B. CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 783-798, 1997b.

SCHERER, R.F.; GARCIA, A. C.; FRAGA, H.P.F.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.A.; GUERRA, M.P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 151, p. 38-45, 2013.

SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; DORNELLES, E.B.; GESING, J.P.A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 63, n. 1, p. 135-138, 2008.

SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; DORNELLES, E.B.; BORTOLI, C.L.R.; QUOIRIN, M. In vitro multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). **Iheringia**, Porto Alegre, v. 64, n. 2, p. 151-156, 2009.

SILVEIRA, D.G.; SOUZA, F.V.D.; PELACANI, C.R.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. Micropropagation and in vitro conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing Bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 4, p. 923-932, 2009. SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Monograph Bromelioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica**, New York, v. 14, n. 3, p. 1493-2141, 1983.

SONEJI, J.R.; RAO, P.S.; MHATRE, M. In vitro regeneration from leaf explants of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, New Delhi, v. 11, p. 117-119, 2002.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 39, p. 450-454, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TAKAHASHI, C.A.; MERCIER, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: characterization of a spatial and functional division. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, p. 1208-1216, 2011.

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 69-73, 2007.

TENG, W.L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, p. 454-457, 1997.

THORPE, T.A. In vitro organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; THAN THANH VAN, K. (Ed.). **Morphogenesis in plants: molecular approaches**. New York: Plenum Press, 1993. p. 19-30.

THORPE, T.A.; JOY IV, R.W.; LEUNG, D.W.M. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 66, n. 1, p. 58-62, 1986,

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

VERDEIL, J.L.; ALEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 6, p. 245-252, 2007.

WENDT, T. **Hibridização e isolamento reprodutivo em *Pitcairnia* (Bromeliaceae)**. 1999. 141 p. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

WILSON, P.J.; STADEN, J. van. Rhyzocaline, rooting cofactors and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 66, p. 479-490, 1990.

ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. In vitro propagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 16, p. 1-495, 1981.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: North Carolina State University, 1984. 505 p.