



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS



CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE BROTOS EM *Aechmea ramosa* var. *ramosa*
MART. EX SCHULT. F. (BROMELIACEAE)**

DANIELE VIDAL FARIA

ALEGRE-ES
NOVEMBRO/2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS



CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE BROTOS EM *Aechmea ramosa* var. *ramosa*
MART. EX SCHULT. F. (BROMELIACEAE)**

DANIELE VIDALA FARIA

“Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, como exigência para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e avaliação obrigatória da disciplina Seminários de Graduação em Ciências Biológicas”

Orientador: Professor (a) Dr.^a Andreia Barcelos Passos Lima

ALEGRE-ES
NOVEMBRO/2011

DANIELE VIDAL FARIA

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE BROTOS EM *Aechmea ramosa* var. *ramosa*
MART. EX SCHULT. F. (BROMELIACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada: _____ de _____ de 20____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof (ª). Dr (a). Andreia Barcelos Passos Lima
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador (a)

Prof (ª). Dr (a). Nina Cláudia Barboza da Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Ms. Elias Terra Werner
Universidade Federal do Espírito Santo

Aos meus pais Marilda e José e meu irmão Leonardo, pelo apoio e carinho, sem vocês esse sonho não seria possível.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por exatamente tudo de bom e ruim, sem ele não teria forças pra dar o próximo passo.

A minha querida orientadora professora Dr.^a Andreia Barcelos Passos Lima pelo acompanhamento e orientação, por me ensinar a arte de fazer ciência e pensar criticamente, pelos conhecimentos transmitidos, e também pela amizade construída ao longo desses anos, que com certeza contribuíram muito para minha formação profissional e pessoal.

A professora Dr.^a Nina Cláudia Barboza da Silva, que com todas as suas responsabilidades teve tempo para dar o apoio e compreensão nos momentos de dificuldade.

Ao doutorando Elias Terra Werner pela ajuda, apoio, e conhecimentos transmitidos no dia a dia no laboratório.

Aos demais amigos de laboratório Ester, Eldelon, Marília, Mariela, Stéfane e a todos os outros pela amizade, alegria, auxílio e troca de conhecimentos. Ao técnico do Laboratório de biotecnologia Fabiano pela disposição e ajuda nos momentos de dificuldade.

A todos os professores que participaram da minha formação acadêmica que além dos conhecimentos transmitidos deixaram um pouco de si em cada um de nós. E com certeza jamais serão esquecidos.

Aos meus pais Marilda e José, pelo grande amor e incondicional apoio na realização de meus sonhos, meu irmão Leonardo, aos meus avós Tereza, José, Nair e Antônio pelo apoio e amor. Vocês são meu porto seguro, fonte de superação e exemplo de vida, a todos vocês devo tudo o que sou.

A todos os amigos que me ajudaram a ver mais longe e principalmente me apoiaram em alguns momentos da minha caminhada, em especial a Andreza, Amélia e Marcos grandes amigos para toda hora.

As colegas da turma de Biologia pelas brigas, brincadeiras, companheirismo, festas, ajuda e convivência ao longo destes quatro anos.

A espécie *Aechmea ramosa* por ter apresentado respostas às condições de tratamentos testadas no presente trabalho.

A UFES e a FAPES pela bolsa e financiamento concedidos ao projeto.

E, finalmente, a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para concretização deste trabalho.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”.

Augusto Cury

RESUMO

A espécie *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. é endêmica da Floresta Atlântica e a fragmentação de seu habitat, torna de grande importância à adoção de medidas que auxiliem na conservação *ex situ* de germoplasma vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de ANA e BAP sobre a formação de brotos *in vitro* de *A. ramosa*. Explantes foliares de plântulas estabelecidas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura MS semi-sólido com concentrações de ANA (0; 1,0; 2,0 μM) e BAP (0; 2,0; 4,0; 6,0 μM). O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3x4 (3 concentrações de ANA e 4 concentrações de BAP) com 6 repetições, sendo a unidade experimental constituída de uma placa de Petri contendo 5 explantes. As análises foram realizadas aos 30 e 60 dias de cultivo. Os melhores resultados foram observados aos 60 dias de cultivo para porcentagem de explantes responsivos (63,33% no meio MS 2 μM ANA 2 μM BAP), porcentagem de formação de calos (56,67% no meio MS 2 μM ANA + 4 μM BAP), porcentagem de formação de raiz (23,33% em meio MS 1 μM ANA), porcentagem de explantes senescentes (100% em meio MS e MS 2 μM ANA); número médio brotações/explantes (6,6 e 8,2, respectivamente, nos meios MS 1 μM ANA + 2 μM BAP e MS 2 μM ANA + 2 μM BAP); comprimento médio dos brotações (0,51 e 0,75cm, respectivamente, nos meios MS 1 μM ANA + 2 μM BAP e MS 2 μM ANA + 2 μM BAP) e número médio de folhas/brotação (3,37 no meio MS 1 μM de ANA). O comprimento médio da maior folha/brotação só foi significativo aos 30 dias nos meios MS 1 μM (0,15cm) e MS 2 μM ANA + 2 μM BAP (0,07 cm). Portanto o meio MS 2 μM ANA + 2 μM BAP foi o mais eficiente na indução de brotos desta espécie de bromeliácea.

Palavras-chave: Micropropagação, explante foliar, brotação, Bromélia, ANA e BAP.

ABSTRACT

The species *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. Ex Schult. f. is endemic to the Atlantic Forest and the fragmentation of their habitat, becomes of great importance the adoption of measures to help the *ex situ* conservation of plant germplasm. The objective of this work was to evaluate the effect of NAA and BAP on *in vitro* formation of shoots of *A. ramosa*. Leaf explants of established seedlings *in vitro* were inoculated in MS medium with semi-solid concentrations of NAA (0, 1.0, 2.0 μ M) and BAP (0, 2.0, 4.0, 6.0 μ M). The experiment was conducted in a factorial 3x4 (3 concentrations of NAA and BAP 4) with six replications, and the experimental unit consisted of a petri dish containing 5 explants. Analyses were performed at 30 and 60 days of cultivation. The best results were observed for 60 days after inoculation for percentage of responsive explants (63.33% in the MS 2 μ M NAA + 2 μ M BAP), percentage of callus formation (56.67% in MS medium 2 μ M NAA + 4 μ M BAP), percentage of root formation (23.33% in the MS 1 μ M NAA), percentage of senescent explants (100% in the MS and MS 2 μ M NAA), average number shoots/explant (6.6 and 8,2, respectively, in MS medium 1 μ M NAA + 2 μ M BAP and MS 2 μ M NAA + 2 μ M BAP), average length of shoots (0.51 and 0.75 cm, respectively, in MS medium 1 μ M NAA + 2 μ M BAP and MS 2 μ M NAA + 2 μ M BAP) and average number of leaves/shoots (3.37 MS medium in 1 μ M NAA). The average length of largest leaf/shoots was only significant at 30 days in MS medium 1 μ M (0.15 cm) and MS 2 μ M NAA + 2 μ M BAP (0.07 cm). So MS medium 2 μ M NAA + 2 μ M BAP was the most efficient in inducing shoots of this kind of bromeliad.

Key-words: Micropropagation, leaf explants, shoots, Brmomeliad, NAA and BAP.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Importância das Bromeliáceas.....	13
1.2. Gênero <i>Aechmea</i>	13
1.3. Micropropagação	15
1.4. Reguladores de Crescimento	16
1.5. Conservação <i>in vitro</i>	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Germinação <i>in vitro</i>	21
4.2 Indução de Brotos.....	21
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS.....	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Foto de *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. encontradas em Burarama distrito de Cachoeiro de Itepeiririm – ES (Fonte: FAVORETO, 2010).....14
- Figura 2.** Regeneração *in vitro* de *A. ramosa* após 60 dias de cultivo *in vitro*. **A.** Explante com formação de calo e aglomerados de brotos em meio MS com 1 μ M ANA + 6 μ M BAP. **B.** Formação de brotos em meio MS com 2 μ M ANA + 4 μ M BAP. **C.** Calogênese em meio MS com 2 μ M ANA + 2 μ M BAP. **D.** Rizogênese a partir da base foliar no meio MS com 1 μ M ANA. Barra = 0,5cm.....23
- Figura 3.** Regeneração *in vitro* de *A. ramosa* após 60 dias de cultivo *in vitro*. **A.** Formação aglomerados de brotos em meio MS com 2 μ M ANA + 2 μ M BAP. **B.** Formação de brotos em no meio MS com 1 μ M ANA + 2 μ M BAP. Barra = 0,5cm.....27
- Figura 4.** Regeneração *in vitro* de *A. ramosa* após 60 dias de cultivo *in vitro*. **A.** Formação aglomerados de brotos com folhas bem desenvolvidas em meio MS com 1 μ M ANA. **B.** Formação de aglomerado de brotos em meio MS com 2 μ M ANA + 6 μ M BAP. Barra = 0,5cm.....28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeito das concentrações de ANA e BAP sobre o número explantes responsivos (ER), formação de calos (FC), formação de raízes (FR) e número de explantes senescentes (ES) de *A. ramosa*, após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*.....22
- Tabela 2.** Análise de variância dos resultados para o número médio de brotações/explante (NBE), comprimento médio das brotações (CB), número médio de folhas/brotação (NF), comprimento médio da maior folha/brotação (CF) em plântulas de *Aechmea ramosa* após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* no meio MS com concentrações de ANA e BAP.....24
- Tabela 3.** Número de médio de brotos por explante de *A. ramosa* após 30 e 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.....25
- Tabela 4.** Comprimento médio das brotações de *A. ramosa* após 30 e 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.....26
- Tabela 5.** Número médio de folhas/brotação de *A. ramosa* após 30 e 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.....27
- Tabela 6.** Comprimento médio da maior folha/brotação de *A. ramosa* após 30 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.....28
- Tabela 7.** Comprimento médio da maior folha/brotação de *A. ramosa* após 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.....29

1. INTRODUÇÃO

A Família Bromeliaceae é composta por 3172 espécies e 58 gêneros (LUTHER, 2008). Atualmente está dividida em oito subfamílias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Bromelioideae (MOBOT, 2008). Sua distribuição é restrita às Américas, ocorrendo da Florida nos Estados Unidos até o sul da Argentina, com apenas uma exceção, *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Midbr., que ocorre na região da Guiné no continente africano (SMITH; DOWNS, 1974).

As Bromeliaceas são monocotiledôneas encontradas nas mais variadas condições de altitude, temperatura e umidade, sendo composta por plantas terrestres, rupícolas e epífitas (WENDT, 1999). Geralmente são herbáceas, variando de plantas de pequeno porte com poucos centímetros até plantas de grande porte, podendo atingir mais de 10 metros de altura (SMITH; DOWNS, 1974; REITZ, 1983). A maioria das plantas apresenta caules contraídos, rizomas horizontais ou estolões, na maioria das vezes inflorescência vistosa e folhas simples dispostas em roseta, usualmente com bainha alargada na base, propiciando a formação de um reservatório de água e nutrientes (REITZ, 1983). Suas folhas apresentam tricomas, que ocorrem principalmente na superfície foliar, estando relacionados com a absorção de água e nutrientes, além de evitar a perda excessiva de água e danos à planta por insolação intensa (NUNES, 2002).

Na Floresta Atlântica as bromeliáceas encontram-se associadas a várias formas de vida já que seus reservatórios de água proporcionam microhabitats, com microflora e microfauna especiais, criando ambientes que favorecem várias relações ecológicas de grande importância para a biodiversidade. Inúmeras espécies ocorrem nas rosetas de bromélias, assim como a germinação de sementes de várias plantas que encontram ali condições ideais para iniciar o seu desenvolvimento (REITZ, 1983).

A maior diversidade da família se encontra na América do Sul. Cerca de 73% dos gêneros e 40% das espécies. A Floresta Atlântica é um dos centros de diversidade da família Bromeliaceae e vários de seus gêneros e espécies são endêmicos deste ecossistema, podendo estar limitados a áreas muito reduzidas (NUNES, 2002). Estima-se que cerca de 40% das bromélias registradas na Floresta Atlântica estão enquadradas em alguma categoria de ameaça; 54 espécies estão incluídas na categoria criticamente em perigo, 89 em perigo, 182 vulneráveis e 17 raras, porém é provável que estes números estejam subestimados devido à deficiência de informações sobre esta família (MARTINELLI et al., 2008).

A exploração dos recursos florestais da Floresta Atlântica tem sido exercida de maneira predatória, o extrativismo para fins comerciais tem se tornado uma das principais fontes de abastecimento do mercado e um dos fatores que ameaçam muitas populações naturais, entre elas as bromélias (MENDES et al.; 2007).

1.1. Importância das Bromeliáceas

Assim como muitas espécies de bromélias a *A. ramosa* possuem grande importância ornamental, sendo amplamente empregada no paisagismo e decoração de ambientes internos, devido à beleza de suas folhas e inflorescências, não necessitando estarem em floração para serem admiradas e comercializadas (NUNES, 2002).

O abacaxi (*Ananas comosus*) é o único representante desta família cultivado extensivamente para fins alimentícios, sendo considerada uma das frutas tropicais mais populares do mundo, principalmente devido ao seu sabor e aromas marcantes (BENNETT, 2000). Resíduos agrícolas provenientes da monocultura do abacaxi apresentam altos teores de carboidratos, proteínas e enzimas proteolíticas (bromelina), que podem ser utilizadas em indústrias para obtenção de amido, fibras, álcool etílico e rações animais (BALDINE et. al., 1993).

Bromélias são consideradas bons indicadores ambientais. Nas regiões tropicais a maioria das espécies é epífita, estando entre as primeiras plantas afetadas pela degradação e derrubadas das florestas, e entre as últimas a se estabelecer nas áreas em recuperação ambiental (MOREIRA, M.J.S., 2008 a). Espécies de bromélias podem ser utilizadas na fitorremediação de solos contaminados, como a *Aechmea blanchetiana* que é bioacumuladora de zinco em suas raízes e parte aérea (ZAMPIERI, 2010).

1.2. Gênero *Aechmea*

As plantas do gênero *Aechmea* são tipicamente neotropicais, possuem porte herbáceo, atingindo entre 40 e 80 cm de altura e sendo muito utilizadas na ornamentação de paisagens domésticas. As folhas apresentam faixas transversais brancas sobre o fundo verde na parte adaxial e roxo escuro na abaxial. Reproduzem-se por brotamento do rizoma e por sementes (MARTINELLI, 2008).

O gênero apresenta dois importantes centros de diversidade na Floresta Atlântica. O primeiro em Pernambuco e Alagoas e outro entre a Bahia e o Rio de Janeiro (MARTINELLI, 2008). Das 254 espécies distribuídas no mundo, 54% estão no domínio da Floresta Atlântica, sendo que 47% são endêmicas (STEHMANN et al., 2009).

A espécie *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. (Figura 1.) é endêmica do Brasil ocorrendo nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (FORZZA et al., 2010). A planta geralmente é terrestre, porém na região de Burarama, sul do Espírito Santo, também apresenta hábito rupícola (FAVORETO, 2010), podendo atingir altura média de 65 cm, incluindo a inflorescência. Suas folhas são verdes rosuladas, formando tanque de água, composta por bainhas mais largas que as lâminas, liguladas, mucronadas, com bordos serrados com espinhos escuros (SILVA; GOMES, 2007).



Figura 1. Foto de *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. encontradas em Burarama distrito de Cachoeiro de Itapemirim – ES (Fonte: FAVORETO, 2010).

O escapo é róseo a vermelho, com brácteas escapais menores que os internódios, róseas com escamas albo-flocosas (SILVA; GOMES, 2007).

Sua inflorescência possui cerca de 23 cm, composta e com brácteas primárias basais iguais ao escapo; as brácteas florais são mucronadas. Suas flores são dísticas, sépalas e múcron com as bases vermelhas e o restante amarelo-esverdeado, assimétricas, livres, com pétalas

linguladas, amarelas, com dois apêndices frimbriados basais, com estames inclusos e ovário subgloboso, ínfero. Os frutos são bacáceos com sementes sem apêndices (SILVA; GOMES, 2007).

1.3. Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro* é a aplicação mais prática da Cultura de tecidos e a que causa maior impacto (TORRES et al., 1998). A técnica está relacionada principalmente com a produção de mudas uniformes, de alta qualidade e livres de patógenos, permitindo rápida multiplicação, preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção (RECH FILHO, 2004).

A propagação vegetativa de bromélias na natureza é lenta e a produção de mudas por meio de sementes não supera as necessidades de propagação destas plantas, pois as taxas de germinação no ambiente natural, em geral, são baixas (MERCIER; KERBAUY; 1995) e seu cultivo para comercialização não supre a demanda do mercado consumidor (SANTOS et al. 2005). Assim, o desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* de bromélias ornamentais é uma importante estratégia para a conservação, pois possibilita maior fornecimento de plantas no mercado, reduzindo a procura por indivíduos provenientes da natureza (TAMAKI et al., 2011).

A regeneração de plantas por organogênese pode ocorrer de duas formas: direta com a produção de gemas aéreas adventícias diretamente do explante e indireta onde a regeneração de gemas ocorre a partir de calos derivados de explantes (TORRES et al., 1998). Em bromélias, as respostas morfogênicas *in vitro* a partir de diferentes fontes de explantes estão geralmente associadas com a organogênese direta, levando à produção de brotos e/ou raízes (CARNEIRO et al., 1999).

Na micropropagação existe um grande número de fatores que influenciam na estabilidade genética e nos diferentes eventos morfogênicos que ocorrem nas células, como: tipo, tamanho, condição fisiológica e sanitária do explante, formulação e constituição física do meio de cultura, balanço hormonal, número de subcultivos e condições de cultivo (TORRES et al., 1998).

Nos protocolos de micropropagação de bromélias podem ser utilizados vários tipos de explantes, como: plântulas (GALVANESE et al. 2007; SILVA et al., 2008; SILVEIRA et al., 2009), segmentos florais (HUANG et al., 2010) ápices caulinares (PARDO et al., 2008), folhas,

caules (CARNEIRO et al, 1999; MENDES et al., 2007; SILVA, A.L.L. et al., 2009) brotos laterais (MATHEWS; RAO, 1992) entre outros.

Tecidos como a região basal de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas apresentam células com potencial morfogenético quando ativado por reguladores de crescimento (GUERRA; VESCO 2010). Estes explantes têm sido utilizados com sucesso em sistemas de cultivo *in vitro* em várias espécies de bromeliáceas (CARNEIRO et al., 1999; MERCIER, KERBAUY, 1997; ALVES, GUERRA, 2001).

1.4. Reguladores de Crescimento

Os hormônios vegetais são compostos químicos endógenos facilmente transportados para células responsivas, onde atuam diretamente na expressão de muitos genes. Tais compostos quando produzidos sinteticamente são chamados de reguladores de crescimento (KERBAUY, 2008).

As auxinas e citocininas controlam os principais eventos celulares e a concentração adequada desses hormônios no meio de cultura representa fator determinante do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura *in vitro* (GALVANESE et al., 2007). A sua adição no meio visa suprir deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que por sua vez encontram-se isolados das regiões produtoras na planta-matriz (TORRES et al, 1998).

As auxinas são produzidas principalmente no meristema apical caulinar, em folhas jovens, frutos em desenvolvimento e em sementes, sendo importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal e estão envolvidas na indução e iniciação da embriogênese somática (TORRES, 1999). Normalmente são associadas à indução de raízes, porém balanços hormonais entre auxinas e citocininas em concentrações adequadas em condições *in vitro* podem induzir a formação de calos, gemas ou raízes (KERBAUY, 2008). Auxinas como ácido indol-3-butírico (AIB) ácido naftalenoacético (ANA) ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) e o hormônio natural ácido indol-3-acético (AIA) estão entre os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos vegetais (TORRES et al., 1998).

As citocininas são produzidas principalmente nas raízes e desempenham um amplo papel nos tecidos vegetais, agindo no processo de formação de gemas caulinares, na quebra da dominância apical, influenciando a divisão, o estabelecimento de drenos, a diferenciação de

cloroplastos e células, a germinação de sementes, o retardo da senescência foliar e a interação planta-patógeno (KERBAUY, 2008). O 6 - benzilaminopurina (BAP) esta entre as citocininas mais utilizadas, estando relacionada principalmente com a formação de brotos (TORRES et al., 1998).

A suplementação de meios de cultura com ANA e BAP tem sido associada com eventos morfogênicos durante o estabelecimento *in vitro* de bromeliáceas. Plântulas de *Aechmea blanchetiana* e *Vriesea gigantea* estabelecidas *in vitro* por meio de sementes apresentaram maior número de brotos no meio MS líquido suplementado com 26,85 μM ANA e 22,62 μM BAP e no meio MS sólido suplementado com 0,54 μM ANA e 2,22 μM BAP, respectivamente (GALVANESE et al. 2007; BENCKE, DROSTE, 2008).

Carneiro et al, (1999) utilizando explantes foliares e hastes caulinares de plântulas estabelecidas *in vitro* de *Neoregelia cruenta* com 7, 14 e 24 semanas de cultivo observaram uma maior formação de brotos em explantes com sete semanas de cultivo nos meio suplementados com 2,5 μM ANA e 22 μM BAP.

Meios de cultura suplementados com ANA e BAP também foram eficientes na indução brotos nas espécies *Dyckia maritima* (SILVA et al., 2008), *Neoglaziovia variegata* (SILVEIRA et al., 2009), *Vriesea scalaris* (SILVA, A. L. L. et al., 2009) e *Billbergia distachia* (MENDES et al., 2007).

1.5. Conservação *in vitro*

A conservação de germoplasma consiste na manutenção de coleções em seus locais de ocorrência, chamada de conservação *in situ* ou por meio da conservação *ex situ*, em locais e condições distintas aos de ocorrência natural, podendo ser realizada *in vitro* ou *ex vitro* (AMARAL et al., 2005).

A conservação *in vitro* tem por objetivo reduzir ou até suprimir o crescimento das células e tecidos, sem afetar sua viabilidade aumentando ao máximo o intervalo entre os subcultivos, reduzindo a mão-de-obra e o espaço necessários para a sua conservação (TORRES, 1999). Esta técnica se torna importante na conservação de espécies com sementes recalcitrantes, cultivares que se propagam vegetativamente, material geneticamente modificado, genótipos elite (AMARAL et al., 2005) e espécies que apresentam poucas informações sobre a sua biologia reprodutiva e o comportamento de sementes como é o caso das bromélias (CARNEIRO;

MANSUR, 2004). Entre as suas vantagens estão a rápida multiplicação e armazenamento, necessidade de pouco espaço para o armazenamento de um grande número de plantas, proteção contra acidentes naturais, disponibilidade imediata para propagação e facilidade de intercâmbio (RAZDAN, 2002; ROCA, ARIAS, CHÁVEZ, 1993; VIEIRA, 2000)

Para a maioria das plantas a conservação do germoplasma é feita por meio de sementes, permitindo a manutenção não só da integridade, mas também da diversidade genética. No entanto, havendo dificuldade na conservação de sementes pode-se adotar a preservação de germoplasma *in vitro* (TORRES et al., 1998). Plântulas obtidas da germinação *in vitro* podem ser doadoras de explantes para processos de micropropagação, auxiliando na redução da atividade extrativista de espécies (MOREIRA et al., 2008) e na conservação e construção de bancos de germoplasma (SILVEIRA et al, 2009).

Não existem trabalhos na literatura sobre a viabilidade e germinação de sementes de *A. ramosa* tanto *ex vitro* com *in vitro*. DUARTE et al. (2011) estudando outra espécie deste gênero, *A. tocantina*, observaram que a porcentagem de germinação das sementes é afetada pelo estágio de maturação dos frutos coletados e pelo tempo de armazenamento, uma vez que após 4 semanas da coleta dos frutos, as sementes apresentaram baixas porcentagens de germinação e vigor, indicando a possibilidade de que suas sementes sejam recalcitrantes. As sementes recalcitrantes podem ser classificadas como de vida curta, ou seja, perdem rapidamente sua viabilidade (FONSECA; FREIRE, 2003), dificultando a produção de mudas e conservação de espécies endêmicas.

A conservação dos recursos genéticos vegetais, frente ao atual estado de destruição ambiental, é atualmente uma demanda de interesse global (AMARAL et al., 2005). Portanto, espécies endêmicas da Floresta Atlântica, como é o caso da *A. ramosa* correm sério risco de desaparecimento e carecem urgentemente de estudos que auxiliem no estabelecimento de estratégias alternativas para sua conservação (SILVA; GOMES, 2007), para que a exploração excessiva do germoplasma nacional não conduza a um cenário de erosão genética irreversível (MOREIRA, 2008).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de ANA e BAP sobre a formação de brotos *in vitro* de *A. ramosa*.

2.1. Objetivos específicos

- Realizar o estabelecimento *in vitro* de *A. ramosa* via germinação de sementes;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ANA (0; 1,0; 2,0 μM) e BAP (0; 2,0; 4,0; 6,0 μM) sobre a indução de brotos, aos 30 e 60 dias de cultivo, utilizando explantes foliares de *A. ramosa*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

O voucher do espécime-testemunho de *A. ramosa* Martius ex Schultes f. foi depositado no herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, sob o número CESJ 55670.

Frutos de *A. ramosa* foram coletados de diferentes indivíduos nativos pertencentes à remanescentes florestais de Floresta Atlântica do Distrito de Burarama, município de Cachoeiro de Itapemirim ao sul do estado do Espírito Santo, nas coordenadas geográficas 20°41'S 41°21'W. Após a coleta, os frutos foram secos ao ar livre, em local sombreado, por sete dias, para completarem sua maturação e facilitar a extração das sementes.

Para montagem do experimento foi criado um *bulk* de sementes, onde um ou dois frutos de cada indivíduo tiveram suas sementes extraídas manualmente e misturadas às sementes dos demais indivíduos, a fim de obter uma amostra representativa de toda a diversidade da população de *A. ramosa* presente nos remanescentes florestais de Burarama. Em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada e posteriormente secas em B.O.D. à 37° C por 24h. Após este procedimento foram armazenados em embalagens de papel filtro em geladeira à 4° C até o uso.

A desinfestação foi realizada em capela de fluxo laminar por imersão em álcool 70% por um minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio comercial (2 - 2,5% de cloro ativo) por cinco minutos e três enxágues em água destilada estéril. Este processo foi repetido duas vezes e então as sementes foram colocadas em papel filtro até o momento da inoculação.

A semeadura foi realizada em meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}) e ágar (7 g.L^{-1}), tendo o pH ajustado a 5,8 e autoclavados por 20 minutos a 121° C. As condições de cultivo da sala de crescimento foram ajustadas para temperatura de 25

$\pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo 16 horas de luz branca do tipo luz do dia (fluorescentes), com fluência de $1,6 \text{ W/m}^2$, após 42 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas a porcentagem de germinação das sementes, considerando como germinada a presença de parte aérea desenvolvida.

Folhas com tamanho médio de 1 cm removidas de plântulas estabelecidas *in vitro* após 42 dias de cultivo *in vitro*, foram utilizados como explantes. Inicialmente as plântulas tiveram suas folhas retiradas cuidadosamente seguindo sua filotaxia com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram selecionadas as mais jovens. Os explantes foram inoculados em meio MS na presença de ANA e BAP para avaliar a indução de brotação.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3×4 (3 concentrações de ANA e 4 concentrações de BAP) com seis repetições, sendo a unidade experimental constituída de uma placa de Petri contendo 5 explantes.

Os tratamentos consistiram em diferentes concentrações de ANA (0; 1,0; 2,0 μM) e BAP (0; 2,0; 4,0; 6,0 μM) adicionadas ao meio MS suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}) e ágar (7 g.L^{-1}), tendo o pH ajustado a 5,8 e autoclavados por 20 minutos a 121°C . Todas as folhas foram inoculadas no meio com a face abaxial em contato com o meio. As condições de cultivo da sala de crescimento foram ajustadas para temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo 16 horas com luz branca do tipo luz do dia (tubos fluorescentes), com fluência de $1,6 \text{ W/m}^2$.

As avaliações foram realizadas aos 30 e 60 dias com auxílio de microscópio estereoscópico (Opton) e paquímetro para mensurar as seguintes variáveis: porcentagem de germinação das sementes, porcentagem de explantes responsivos (ER), porcentagem da formação de calos (FC), porcentagem da formação de raízes (FR), porcentagem de explantes senescentes (ES), número médio de brotações/explante (NBE), comprimento médio das brotações (CB), número médio de folhas/brotação (NF), comprimento médio da maior folha/brotação (CF).

Foi considerado como explante responsivo aquele que apresentou a formação de brotos, calos e/ou raízes. Explantes senescentes foram considerados aqueles cujas folhas se mostravam amareladas, devido ao processo natural de envelhecimento celular, sendo que em alguns casos, foi observada também a formação de brotos raízes e/ou calos nestes explantes.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade sendo comparado, utilizando o programa Assistat 7.6 beta (SILVA, F.A.S.E., 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação *in vitro*

No estabelecimento *in vitro* de *A. ramosa* a partir de sementes verificou-se uma porcentagem de germinação de 55% após 42 dias de cultivo. Estes resultados não corroboram com os encontrados por Rocha (2010) o qual obteve para outras espécies do mesmo gênero, *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* 100% das sementes germinadas em meio MS. Galvanese et al. (2007) também encontraram 100% de germinação para *Aechmea blanchetiana* em meio MS modificado, com 20% das concentrações de macro e micronutrientes.

Os frutos de *A. ramosa* tiveram sua maturação finalizada após a coleta, e as sementes foram armazenadas em papel filtro em geladeira até o momento do uso, esses fatores podem ter afetado a viabilidade das sementes uma vez que PEREIRA et al. (2010) trabalhando com a germinação de *Nidularium innocentii* observou que a porcentagem de germinação das sementes diminuiu ao longo do tempo de armazenamento, mantendo sua viabilidade apenas por três meses.

Segundo DUARTE et al. (2011) sementes de *A. tocantina* coletadas em diferentes estágios de maturação apresentaram 100% de germinação em frutos cujos pericarpos apresentavam coloração amarela até alaranjada e com teor de água entre 21% e 25%, atingindo em torno de 100% de germinação aos 23 dias após a semeadura *in vitro* em meio MS acrescido com metade das concentrações de micro e macronutrientes. Esses mesmos autores recomendam a execução de outros estudos sobre a germinação de *A. tocantina* após armazenamento, uma vez que a redução do teor de água das sementes levou a uma tendência de redução da germinação e vigor, indicando a possibilidade de recalcitrância das sementes. Portanto é preciso mais estudos sobre o armazenamento, vigor e a germinação *ex vitro* e *in vitro* das sementes de *A. ramosa*.

4.2 Indução de Brotos

As diferentes concentrações de ANA e BAP, em vários tratamentos levaram a indução de brotos raízes e/ou calos e em alguns explantes foi observado senescência foliar. O meio MS

controle não apresentou qualquer tipo de resposta indicando a necessidade da suplementação dos meios com reguladores de crescimento pra induções da morfogênese em *A. ramosa* (tabela1).

Tabela 1. Efeito das concentrações de ANA e BAP sobre o número explantes responsivos (ER), formação de calos (FC), formação de raízes (FR) e número de explantes senescentes (ES) de *A. ramosa*, após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*.

Meio (μM)	ER (%)		FC (%)		FR (%)		ES (%)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
MS 0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
1,0 ANA	30,0	30,0	6,7	23,3	10,0	23,3	70,0	83,3
2,0 ANA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
2,0 BAP	10,0	13,3	0,0	3,3	0,0	0,0	43,3	90,0
4,0 BAP	26,7	26,7	13,3	26,7	0,0	0,0	10,0	66,7
6,0 BAP	30,0	30,0	6,7	23,3	0,0	0,0	13,3	56,7
1,0 ANA + 2,0 BAP	33,3	36,7	33,3	33,3	0,0	3,3	30,0	70,0
1,0 ANA + 4,0 BAP	13,3	13,3	3,3	13,3	0,0	3,3	36,7	76,7
1,0 ANA + 6,0 BAP	26,7	40,0	16,6	33,3	0,0	0,0	30,0	56,7
2,0 ANA + 2,0 BAP	46,7	63,3	20,0	56,7	3,3	6,7	26,7	83,3
2,0 ANA + 4,0 BAP	26,7	60,0	16,7	53,3	6,7	10,0	13,3	90,0
2,0 ANA + 6,0 BAP	26,7	33,3	10,0	30,0	0,0	3,3	66,7	73,3

Os melhores resultados para a porcentagem de explante responsivos foram encontrados após 60 dias de cultivo nos meios MS com 2,0 μM ANA + 2,0 μM BAP (63, 3%) e 2,0 μM ANA + 4,0 μM BAP (60,0%), indicando que essas condições foram favoráveis às melhores respostas morfogenéticas para *A. ramosa* (Tabela 1.)

Os explantes foliares apresentaram diferentes tipos de respostas nas diferentes concentrações de ANA e BAP, todas ocorrendo a partir da base da folha. Foi possível observar a formação de calos, raízes e indução de brotos (Figura 2). Resultados similares também foram observados por Alves et al. (2006) ao estudar a micropropagação de *Vriesea reitzii* a partir de explantes provenientes de bases foliares e também por Carneiro et al. (1999) trabalhando com *Neoregelia cruenta*. As bases foliares de bromélias apresentam elementos vasculares cujas células podem ser competentes para a re-diferenciação quando ativadas por reguladores de crescimento (GUERRA; VESCO 2010).

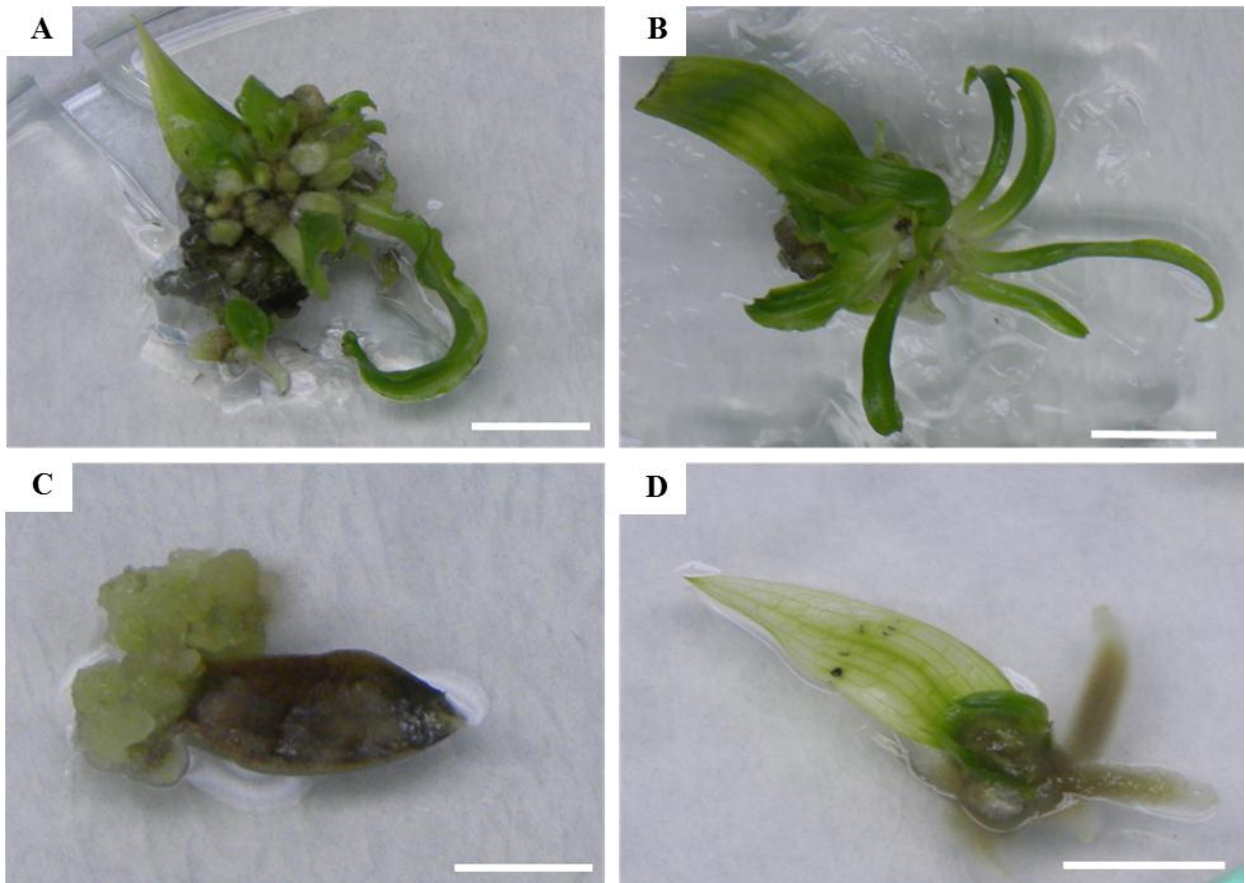


Figura 2. Regeneração *in vitro* de *A. ramosus* após 60 dias de cultivo *in vitro*. **A.** Explante com formação de calo e aglomerados de brotos em meio MS com 1 μM ANA + 6 μM BAP. **B.** Formação de brotos em meio MS com 2 μM ANA + 4 μM BAP. **C.** Calogênese em meio MS com 2 μM ANA + 2 μM BAP. **D.** Rizogênese a partir da base foliar no meio MS com 1 μM ANA. Barra = 0,5cm.

Dos explantes responsivos, alguns formaram calos (Figura 2C). Para a maioria dos tratamentos, as maiores porcentagens para a formação de calos foram observadas em geral, após 60 dias de cultivo, e em maiores porcentagens nos meios MS 2,0 μM ANA + 2,0 μM BAP (56,7 %) e 2,0 μM ANA + 4,0 μM BAP (53,3 %) (Tabela 1). Em *Ananas comosus* plântulas mantidas após 30 dias em meio MS com 13,32 μM de BAP apresentaram a formação de grande número de brotos e expressiva presença de calos nos explantes (DIAS et al., 2008). A formação de calos é considerada uma fonte de variação somaclonal (COLUCCI, 2006). Para a conservação de espécies é desejável a manutenção da estabilidade dos tecidos, permitindo que estes possam representar a diversidade genética das espécies. Deste modo é muito importante que os sistemas de propagação *in vitro* sejam estáveis (TORRES et al., 1998).

Em alguns tratamentos foi observada a indução de rizogênese, com as maiores porcentagem de formação de raízes também observadas aos 60 dias. Este tipo de resposta ocorreu apenas nos meios MS 1 μM ANA, 1 μM ANA + 2 μM BAP, 1 μM ANA + 4 μM BAP, 2 μM ANA + 2 μM BAP, 2 μM ANA + 4 μM BAP e 2 μM ANA + 6 μM BAP em baixas

porcentagens (Tabela 1). O ANA está diretamente relacionado a indução de raízes (KERBAUY, 2008), justificando a maior ocorrência de raízes no meio MS com 1 μM ANA, indicando que concentrações como 1 μM de ANA podem ser utilizadas para enraizamento de plântulas de *A. ramosa*. Naves et al. (2003) encontraram resultados semelhantes para *Alcantarea imperialis*, onde as concentrações de 0,54 a 10,74 μM de ANA promoveram rizogênese em 100% de brotos. A presença de raízes nas plântulas para algumas espécies é essencial ao processo de aclimatização (NAVES et al., 2003).

No tratamento controle e o meio MS com 2 μM BAP foi observado 100% dos explantes senescentes e nenhum tipo de resposta (Tabela 1). As citocininas agem promovendo o retardo da senescência foliar (KERBAUY, 2008) e esse padrão foi observado em *A. ramosa*, onde todos os tratamentos suplementados com BAP aos 30 dias apresentaram menores porcentagens para o NES se comparado às concentrações de ANA (Tabela 1).

A análise de variância mostrou a ocorrência de interação significativa entre as concentrações de ANA e BAP, aos 30 e 60 dias, para as variáveis: número médio de brotações/explante, comprimento médio das brotações e número médio de folhas/brotação, e aos 30 dias apenas para comprimento médio da maior folha/brotação (Tabela 2). Diversos autores observaram que BAP em combinação com ANA induz a formação de brotos, raízes e/ou calos em muitas espécies de bromélias como em *N. cruenta* (CARNEIRO et al. 1999), *A. blanchetiana* (GALVANESE et al. 2007) e *V. gigantea* (BENCKE, DROSTE, 2008).

Tabela 2. Análise de variância dos resultados para o número médio de brotações/explante (NBE), comprimento médio das brotações (CB), número médio de folhas/brotação (NF), comprimento médio da maior folha/brotação (CF) em plântulas de *Aechmea ramosa* após 30 e 60 dias de cultivo in vitro no meio MS com concentrações de ANA e BAP.

	NBE		CB		NF		CF	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
ANA	6,02 **	5,59 **	11,17 **	12,98 **	4,85 *	7,75**	3,05 ^{ns}	1,70 ^{ns}
BAP	3,52*	4,39 **	6,44 **	7,66 **	3,35 *	2,60 ^{ns}	0,59 ^{ns}	3,91 *
Interação ANA e BAP	6,00 **	2,45 *	11,89 **	9,53 **	7,25 **	5,75 **	3,50 **	1,20 ^{ns}

** Valor de F significativo ao nível de 1% de probabilidade; * Valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo

No período de cultivo de 60 dias foi observado, para todos os tratamentos, os maiores valores de NBE (Tabela 2). O meio MS 2 μM ANA + 2 μM BAP apresentou os maiores valores para o NBE tanto aos 30 quanto aos 60 dias de cultivo, 2.567 e 8.200, respectivamente, não diferindo estatisticamente do meio MS 1 μM ANA + 2 μM de BAP, 1.77 e 6.60, respectivamente (Tabela 1; Figura 3). Rocha (2010) estudando a micropropagação das espécies

Aechmea bromeliifolia (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* observou os melhores resultados, independente da espécie, no meio MS suplementado com 8,87 μM BAP e 2,69 μM ANA levando à formação de 8,81 brotos por explante, aos 255 dias de cultivo.

Para a organogênese é preciso que o explante adquira competência, indução, diferenciação e desenvolvimento morfológico, resultando na formação de brotos e raízes (CHRISTIANSON; WARNICK, 1985). Os resultados deste trabalho mostraram que, provavelmente aos 60 dias, os explantes de *A. ramosa* apresentaram valores mais expressivos para o desenvolvimento morfológico dos tecidos quando comparado aos 30 dias de cultivo.

Tabela 3. Número de médio de brotos por explante de *A. ramosa* após 30 e 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.

BAP (μM)	ANA (μM)					
	30 dias			60 dias		
	0	1	2	0	1	2
0	0,00 bA	2,10 aA	0,00 bB	0,00 aA	3,57 aA	0,00 aC
2	0,13 bA	1,77 aAB	2,57 aA	0,33 bA	6,60 aA	8,20 aA
4	0,80 aA	0,83 aAB	0,40 aB	2,10 aA	3,07 aA	2,43 aBC
6	0,83 aA	0,57 aB	0,90 aB	2,57 aA	3,10 aA	5,13 aAB

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Resultados semelhantes com os obtidos no presente trabalho foram observados para as espécies *Aechmea fasciata* e *Vriesea brusquensis* onde as melhores concentrações para indução de brotações foram observadas em meio MS 2 μM ANA + 4 μM BAP, com a formação de 5-8 brotos após 8 semanas de cultivo (GUERRA; VESCO, 2010). Silva, A.L.L. et al. (2009) também observaram resultados semelhantes estudando a micropropagação de *Vriesea scalaris* a partir de sementes verificaram a formação de 8,8 brotos por explante na concentração de 4,5 μM de BAP em meio MS. Pompelli e Guerra (2005), estudando a micropropagação de *Dyckia distachya*, observaram maiores taxas de regeneração no meio MS líquido suplementado com 2 μM ANA, 4 μM BAP e 6 μM TDZ, resultando na indução de 133,58 brotos por planta após 142 dias de cultivo. Galvanese et. al (2007) observaram que a combinação de 26,4 μM de BAP com 5,37 μM de ANA, em Meio MS semi-sólido, proporcionou um número médio de 62 brotações por explante aos 180 dias de cultivo, em plantas de *Aechmea blanchetiana*.

O meio MS 1 μM ANA e com qualquer concentração de BAP e o meio MS 2 μM ANA + 6 μM de BAP aos 60 dias de cultivo também apresentou porcentagens significantes para o número médio de brotos por explante. Naves et al.(2005) estudando rizogênese em *Alcantarea*

imperialis também observaram a formação de 1,7 brotos no meio MS suplementado com ANA na concentração de 7,02 μM .

A condição fisiológica do tecido, a variabilidade genética e o balanço hormonal entre os níveis de citocininas, exógenas e endógenas podem estimular de várias formas a proliferação celular (HANSEN et al., 2009, TORRES et al., 1999). Mercier et al., (2003) estudando a relação entre concentrações exógenas e endógenas de auxinas e citocininas em *Ananas comosus* observaram que o equilíbrio hormonal exógeno (5,37 μM de ANA e 8,87 μM BAP) promoveu a formação de protuberâncias em 40% dos explantes (bases foliares) e a regeneração de 3,5 brotos após 15 dias de cultivo.

Para a variável comprimento médio das brotações, os maiores valores foram observados no meio MS 2 μM ANA + 2 μM BAP, 0,322 e 0,755 aos 30 e 60 dias de cultivo, respectivamente, embora não diferindo estatisticamente do meio MS 1 μM ANA + 2 μM de BAP, com 0,225 e 0,519, nas duas avaliações, respectivamente (Tabela 3; Figura 3.)

Em relação ao ANA, o efeito foi mais expressivo na concentração de 1 μM sozinho ou combinado com 2 μM BAP e na concentração de 2 μM combinada com 2 μM BAP aos 30 dias 60 dias. Rocha (2010) observou maiores tamanhos para o comprimento médio dos brotos nas espécies de *A. bromeliifolia*, *A. distichantha*, *A. multiflora* e *H. catingae* na ausência de ANA e com menores concentrações de BAP. Silveira et al. (2009) observaram resultado similar com Caroá, quando o meio de cultivo acrescido de BAP promoveu maior número de brotações, entretanto os brotos eram pequenos e apresentavam baixas taxas para rizogênese. Huang et al., (2011) observaram para *Guzmania* 'Hilda' maior alongamento das plântulas em meio suplementado com as concentrações de 2,69 μM de ANA e 5,37 μM de ANA.

Tabela 4. Comprimento médio das brotações de *A. ramosa* após 30 e 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.

BAP (μM)	ANA (μM)					
	30 dias			60 dias		
	0	1	2	0	1	2
0	0,00 bB	0,28 aA	0,00 bC	0,00 bA	0,66 aA	0,00 bC
2	0,04 bAB	0,22 aA	0,33 aA	0,14 bA	0,52 aAB	0,75 aA
4	0,12 aA	0,10 aB	0,91 aBC	0,24 aA	0,14 aC	0,21 aBC
6	0,12 aAB	0,01 aB	0,15 aB	0,20 aA	0,37 aBC	0,31 aB

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

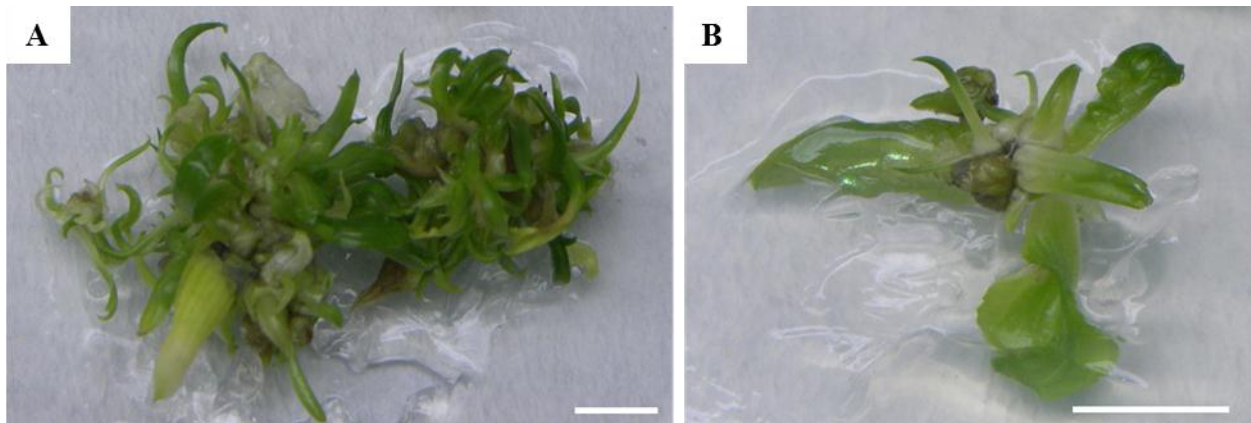


Figura 3. Regeneração *in vitro* de *A. ramosa* após 60 dias de cultivo *in vitro*. **A.** Formação aglomerados de brotos em meio MS com 2 μ M ANA + 2 μ M BAP. **B.** Formação de brotos em no meio MS com 1 μ M ANA + 2 μ M BAP. Barra = 0,5cm.

Quanto à variável número médio de folhas/brotação todos os tratamentos apresentaram os melhores resultados após 60 dias de cultivo (Tabela 4). O meio com MS 1 μ M apresentou os valores mais significativos para essa variável aos 30 e 60 dias, 1 e 3,37, respectivamente (Tabela 4 e Figura 4. A). Em relação ao BAP, o efeito foi mais expressivo na concentração de 1 μ M e 2 μ M com qualquer uma das concentrações de ANA após 60 dias de cultivo (Tabela 4.; Figura 4B). Fernandes et al., (2011) estudando a germinação *in vitro* e desenvolvimento de plântulas de *Aechmea tocontina* observaram que sementes germinadas em meio MS $\frac{1}{2}$ (50% da concentração de sais), MS $\frac{1}{2}$ com 1,44 μ M GA₃ e MS $\frac{1}{2}$ com 1,44 μ M GA₃ + 0,44 μ M BAP após 60 dias deram origem a plântulas com médias de 16,67, 15,34 e 14,96 folhas e 4,15 cm, 3,66 cm e 3,96 cm para comprimento da parte aérea, respectivamente. Para *Aechmea bromeliifolia* sementes inoculadas em meio MS $\frac{1}{2}$ com 1,44 μ M GA₃ + 0,44 μ M BAP produziram em média 9,94 folhas após 60 dias de cultivo (MONTEIRO et al., 2011).

Tabela 5. Número médio de folhas/brotação de *A. ramosa* após 30 e 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.

BAP (μ M)	ANA (μ M)					
	30 dias			60 dias		
	0	1	2	0	1	2
0	0,00 bA	1,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	3,37 aA	0,00 bB
2	0,20 aA	0,23 aB	0,40 aA	0,53 aA	1,70 aB	1,73 aA
4	0,07 aA	0,10 aB	0,07 aA	0,47 aA	0,60 aB	0,53 aAB
6	0,10 aA	0,03 aB	0,23 aA	0,57 aA	0,43 aB	0,83 aAB

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

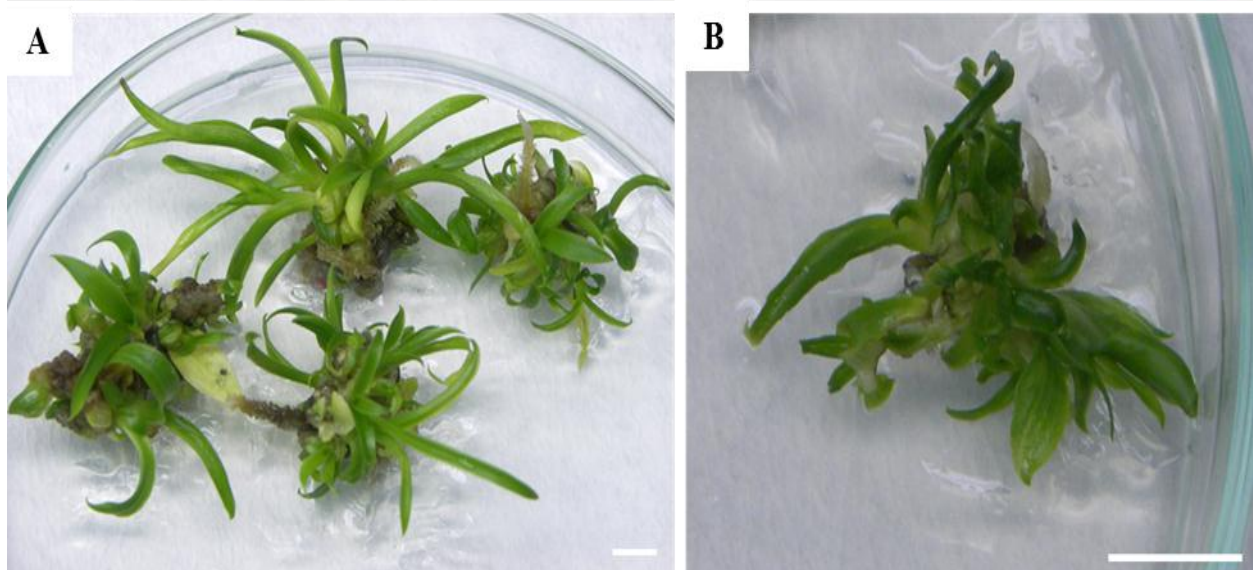


Figura 4. Regeneração *in vitro* de *A. ramosa* após 60 dias de cultivo *in vitro*. **A.** Formação aglomerados de brotos com folhas bem desenvolvidas em meio MS com 1 μM ANA. **B.** Formação de aglomerado de brotos em meio MS com 2 μM ANA + 6 μM BAP. Barra = 0,5cm.

Para a variável comprimento médio da maior folha/brotação em relação ao ANA, os maiores valores foram observados no meio MS 1 μM ANA (0.15) e MS 2 μM ANA + 2 μM BAP (0.07). Já em relação ao efeito de BAP, o meio MS 1 μM ANA foi mais eficiente (Tabela 5 e Figura 4A).

Tabela 6. Comprimento médio da maior folha/brotação de *A. ramosa* após 30 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.

BAP (μM)	ANA (μM)		
	0	1	2
0	0,00 bA	0,15 aA	0,00 bA
2	0,04 aA	0,06 aAB	0,07 aA
4	0,02 aA	0,03 aB	0,03 aA
6	0,03 aA	0,02 aB	0,06 aA

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Aos 60 dias de cultivo, não foi observado interação significativa entre as concentrações de ANA e BAP para o CF (Tabela 6).

Tabela 7. Comprimento médio da maior folha/brotação de *A. ramosa* após 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.

ANA	
0	0,07233 a
1	0,13036 a
2	0,11088 a
BAP	
0	0,04472 b
2	0,16656 a
4	0,08633 ab
6	0,12048 ab

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Monteiro et al. (2011) trabalhando com *A. bromeliifolia* observaram maior tamanho das plântulas em MS ½ com 1,44 µM de GA₃ com média de 7,17 cm e MS com média de 6,58 cm. Para *Vriesea gigantea* após 12 meses em cultura, o comprimento da maior folha/brotação foi, em média, de 1,65 cm no meio MS com 4,44 µM BAP e 1,07 µM ANA e de 1,42 cm no meio MS 2,22 µM BAP e 0,54 µM de ANA (BENCKE; DROSTE, 2008). A adição de ANA conjugada com uma citocinina tem como objetivo anular o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das culturas, ou até mesmo promover o seu enraizamento inicial e manutenção da dominância apical (TORRES, 1998).

No presente trabalho o meio MS 2 além de apresentar maiores valores para o número médio de folhas/brotação e comprimento médio da maior folha/brotação, também apresentou a formação de 2.1 (aos 30 dias) e 3.57 (aos 60 dias) brotos. Isso indica que as concentrações endógenas de citocininas dos explantes foram satisfatórias para a indução brotos. Na literatura se observa a ocorrência de organogênese em espécies pertencentes ao mesmo gênero *Aechmea* (GALVANESE et. al., 2007, GUERRA; VESCO, 2010, ROCHA, 2010) em doses mais elevadas de citocininas se comparado aos observados no presente trabalho, indicando possivelmente que *A. ramosa* apresenta maiores concentrações endógena de citocininas.

5. CONCLUSÕES

Foi observado 55% de porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *A. ramosa*.

Os melhores resultados para a porcentagem de explantes responsivos foram encontrados após 60 dias de cultivo nos meios MS 2 µM ANA + 2 µM BAP (63,33%) e MS 2 µM ANA + 4 µM BAP (60,00%);

Os meios MS 2 μM ANA + 2 μM BAP (56,67%) e MS 2 μM ANA + 4 μM BAP (53,33%) apresentaram as maiores porcentagens para a formação de calos aos 60 dias de cultivo;

As maiores porcentagem para a formação de raízes foram observadas aos 60 dias de cultivo, no meio MS 1 μM ANA (23,33%).

Os meios MS 1 μM ANA + 2 μM BAP (6,60) e MS 2 μM ANA + 2 μM BAP (8,20) foram mais eficientes para a indução de número médio de brotos, tanto aos 30 quanto aos 60 dias de cultivo;

Os meios MS 1 μM ANA + 2 μM BAP (0,52), MS 2 μM ANA + 2 μM BAP (0,75) e concentrações de 1 μM de ANA combinado com 2 μM BAP e na concentração de 2 μM combinada com 2 μM BAP aos 30 dias 60 dias de cultivo promoveram maiores valores para o comprimento médio das brotações.

Para o número médio de folhas/brotação, aos 30 e 60 dias de cultivo, apenas o meio MS 1 μM (1 e 3,37 respectivamente) foi eficiente. Já aos 60 dias 1 μM ANA ou 2 μM ANA com qualquer das concentrações de BAP;

Aos 30 dias de cultivo nos meios MS 1 μM (0,15) e MS 2 μM ANA + 2 μM BAP (0,07) verifica-se os maiores valores para o comprimento médio da maior folha/brotação;

Portanto o meio MS 2 μM ANA + 2 μM BAP foi o mais eficiente na indução de brotos podendo ser utilizado em protocolos de micropropagação de *A. ramosa* para fins ornamentais e de conservação *in vitro* desta espécie.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, G. M.; GUERRA, M. P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 51 n. 5, p. 202-212, 2001.
- ALVES, G. M.; VESCO, L. L. D.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae* v. 110, p. 204–207, 2006.
- AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis**. 2005. 94f. (Dissertação Mestrado) - Instituto Agrônômico (IAC). Campinas, 2005. and Molecular Genetics. Disponível em http://www.sivb.org/edu_terminology.asp. Acesso em: 20 outubro 2011.
- BALDINE, V. L. S.; IADEROZA, M; FERREIRA, E. A. H.; SALES, A. M.; DRAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da Bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de alimentos**,v.23, n.1, p.44-55, 1993.
- 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 Botânica**, v. 59, p. 299-306, 2008.
- BENNETT, B. C. Em Ethnobotany of Bromeliaceae in Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation; In: Benzing, D. H., ed. Cambridge University: Cambridge, 2000, cap 14.
- CARNEIRO, L. A. & MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidália* n. 2, v. 1, p. 12-20, 2004.
- CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G; BRITO, C. J. M. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 55, p.79-83, 1999.
- CHRISTIANSON, M. L; WARNICK, D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Develop. Biol.** v.112,p.494 - 497, n.1985.
- COLUCCI, F. Cultura de tecidos de *Euphobia Heterophylla*. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual De Ponta. Ponta Grossa, 2006.

DIAS, G. M. G.; CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; MORAIS, J. P. S. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *Ananassoides*) por estiolamento e regeneração de lântulas. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.4, n.1, p. 1-7, 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2008.

DUARTE, E. F.; CARNEIRO, M. F.; CARNEIRO, I. F. 2011. **Qualidade físico-fisiológica de sementes de *Aechmea tocartina* Baker obtidas de frutos com diferentes graus de maturação.** Disponível em: http://scholar.google.com.br/scholar?cluster=3549224966246499304&hl=pt-BR&as_sdt=0,5. Acesso em: 06 dezembro 2011.

FAVORETO, F. C. 2010. 63 f. Bromeliaceae do distrito de burarama (Cachoeiro de Itapemirim, ES, Brasil) Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, 2010.

FERNANDES, F. P. R.; MONTEIRO, M. M.; RODRIGUES, M. A. F.; CARNEIRO, M. F.; SIBOV, S. T. Germinação *In Vitro* E Avaliação Do Desenvolvimento De Plântulas De *Aechmea tocartina* Baker (Bromeliaceae) In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), 63, 2011. Goiania, GO. **Anais/resumos** da Reunião Anual da SPC, Goiania, GO. 2011. 1-2 p.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.2, p.297-303, 2003.

FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; MARTINELLI, G. 2010. Bromeliaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005865>. Acesso em: 14 outubro 2011.

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**, v. 54 n. 311, p. 63-67, 2007.

GUERRA, M. P.; VESCO, L. L. D. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads In: S.M. Jain and S.J. Ochatt (eds.), Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants, **Methods in Molecular Biology**, v. 589, p. 47-66, 2010.

HANSEN, D. S.; M. A. P. C. COSTA DANTAS, A. C. V. L.; LEDO, C. S.; GARCIA, F. R.; HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience**, v. 15, n. 5, p. 603-604, 2009.

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. **Cell Tiss Organ Cult**, v. 130, p. 894 - 898, 2010.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, ed. 2. 2008. 431 p.

LUTHER, H. E. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials, **The Bromeliad Society International**, The Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota, Florida, USA., ed. 7, 2008.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.

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**, v. 1, p. 108-110, 1992.

MENDES, G. C.; SOARES, C. Q. G.; BRAGA, V. F.; PINTO, L. C.; SANTANA, R.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) Mez (bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociência**, v. 5, p. 972-974, 2007 b.

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

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAY, Y. P. S. (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Floresty**, v. 40. Berlin: Springer verlag, p. 43-57, 1997.

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

MOBOT, 2011. **Missouri Botanical Garden, W³ Specimen Data Base**. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/>. Acesso em: 13 setembro 2011.

MONTEIRO, M. M.; FERNANDES, F. P. R.; MÁRCIO AUGUSTO FERREIRA RODRIGUES, M. A. F.; CARNEIRO, M. F.; SIBOV, S. T. germinação *in vitro* e avaliação do

desenvolvimento de plântulas de *Aechmea bromeliifolia* (rudge) Baker (bromeliaceae). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), 63, 2011. Goiania, GO. **Anais/resumos** da Reunião Anual da SPC, Goiania, GO. 2011. 1-2 p.

MOREIRA, M. J. S. Conservação *in vitro* de Bromeliáceas. Cruz das Almas, BA, 2008. 61p. a.

MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D.; BASTOS, L. P.; ROCHA, M. A. C.; Germinação de sementes *in vitro* de espécies de bromélias ameaçadas de extinção. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 4, p. 321-327, out./dez., 2008. b.

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

NAVES, V. C.; PAIVA, P. D. O. ; PAIVA, R.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; PAIVA, L. V. Enraizamento e aclimatização de brotos regenerados *in vitro* de bromélia imperial. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, Campinas, v.11, n.1, p.62-66, 2005.

NAVES, V. C.; PAIVA, P. D. O.; 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.

NUNES, J.V.C. BROMÉLIAS. IN: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (ed). **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**, São Paulo: SENAC, 2002, p.119-132.

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** v. 42, n. 4 , p. 491–505 2008.

PEREIRA, C.; CUQUEL, F. L.; PANOBIANCO, M. Germinação e armazenamento de sementes de *Nidularium innocentii* (Lem.) **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 32, n. 2 p. 036-041, 2010.

POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Micropropagation enables the mass propagation of *Dyckia distachya*. **Crop breeding and Applied Biotechnology**, v. 5: 117-126, 2005.

RAZDAN, M.K. **Introduction to plant tissue culture**. USA:Science Publisher, 2ª ed. 2002. 375p.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias.** 2004.74p. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Agrárias Departamento de Fitotecnia Programa de Pós-Graduação Em Recursos Genéticos Vegetais Florianópolis, SC, Agosto de 2004.

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** v.14, p. 1799–1808, 2005.

REITZ, R. Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. **Fl. Ilustr. Catarinense**, Parte. Fasc. Brom., 1983. 518p.

ROCA, W.M.;ARIAS, D.I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. IN: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (ed). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones.** Cali, Colombia: CIAT. p. 697 – 714, 1993.

ROCHA, M. A. C. Multiplicação e conservação de bromeliáceas ornamentais. 2010. 99 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Agrárias: Fitotecnia.) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2010.

SANTOS, A. J.; BITTENCOURT, A. M.; NOGUEIRA, A. S. Aspectos Econômicos da Cadeia Produtiva das Bromélias na Região Metropolitana de Curitiba e Litoral Paranaense. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 35, n. 3, set./dez. 2005.

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

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

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **World Congress On Computers Inagriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, N. N. F.; GOMES, J. M. L. Bromeliaceae do Sítio Santo Antônio, Morro do céu, Itaiobaia, Serra-ES. **Enciclopédia Biosfera**, n.1, 2007.

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**, v.52, n. 4, p. 923-932, 2009.

SMITH, L.B. e DOWNS, R.J. Pitcairnoideae. (Bromeliaceae). Fl. Neotrop. Monagr. V. 14, n. 1, p.1- 658. The New York Botanical Garden, New York. 1974.

STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009.

TAMAKI, V.; CARVALHO, C.; PAULA, S. M.; KANASHIRO, S. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 35, n.1, p. 91-97, 2011.

TORRES, C.T.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/Embrapa – CNPH, v. 1, 1999. 509 p.

TORRES, C.T.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/Embrapa – CNPH, v. 2, 1998. 863 p.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 14, p. 18, 2000.

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

ZAMPIERI, M.C.T. **Estudo Sobre os Efeitos do Cobre e Zinco no Crescimento da Plântula de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith Cultivada *in vitro*. Aplicação da Análise por Ativação com Nêutrons**. 2010. 166p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.