



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 de *Billbergia euphemiae* E. Morren (Bromeliaceae)

Mariela Justiniano Simão

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 de *Billbergia euphemiae* E. Morren (Bromeliaceae)

Mariela Justiniano Simão

“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) Andreia Barcelos Passos Lima

ALEGRE-ES

Novembro/2011

Mariela Justiniano Simão

Indução *in vitro* de brotos de *Billbergia euphemiae* E. Morren (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: __/__/____.

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

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

*“Man is now able to fly through the air like a bird,
He's able to swim beneath the sea like a fish,
He's able to burrow beneath the ground like a mole.*

*Now if only he could walk the earth like a man,
This would be paradise.”*

- **Tommy Douglas**

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha família, pai e mãe, pelo eterno apoio e amor, sem os quais não conseguiria chegar até aqui.

Aos meus grandes amigos, Natália, Raissa, Marta, Paula e Augusto, que mesmo distantes, sempre estiveram do meu lado me dando força e coragem para seguir em frente.

A professora Andreia Barcelos, pela orientação e incentivo, e por toda a paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório, Dani, Elias e Stéfanie, por todo o apoio naquelas longas horas de trabalho, preparando meios e contando os eternos brotos.

As amigas Anelise, Samara e Poliana, por terem gastado algumas preciosas horas de seus dias (e noites) me ajudando nos momentos de desespero!

A professora Adriane Braga, pelo apoio incondicional e principalmente, pela amizade durante todo o curso.

Aos colegas de turma e professores, por todos os puxões de orelha e brincadeiras, que de alguma forma, me ajudaram a ser quem eu sou.

A todos aqueles não citados aqui, que de alguma forma estiveram torcendo por mim durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

As bromélias constituem um importante grupo para a manutenção da Floresta Atlântica, com várias espécies ameaçadas de extinção devido ao extrativismo exacerbado e a destruição de seus habitats naturais. Visto a necessidade do desenvolvimento de protocolos para a conservação destas espécies, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito de diferentes concentrações de ANA e BAP na indução *in vitro* de brotos de *Billbergia euphemiae*. Plântulas germinadas *in vitro* tiveram suas folhas retiradas após 42 dias e inoculadas em placas de Petri com meio MS contendo diferentes combinações de ANA (0, 1 e 2 μM) e BAP (0, 2, 4 e 6 μM), acrescido de sacarose (30 g.L^{-1}) e ágar (7 g.L^{-1}). O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3x4 (ANA x BAP) em DIC, com 6 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa com cinco explantes. Foram feitas avaliações aos 30 e 60 dias de cultivo. Os melhores resultados para número de brotos por explantes e comprimento da brotação foram observados nos tratamentos MS + 1 μM ANA e MS + 6 μM BAP com 60 dias de cultivo. O número médio de folhas foi maior no tratamento contendo MS + 1 μM ANA. A presença de BAP não foi significativa para este parâmetro. A interação de MS + 1 μM ANA com ausência de BAP apresentou o melhor valor para a variável comprimento da maior folha, sem apresentar diferença significativa entre a interação entre MS + 1 μM ANA e MS + 2 μM BAP. O presente estudo permitiu determinar condições *in vitro* para a indução de brotos a partir de explantes foliares da bromeliácea *B. euphemiae*. Para uma aplicação prática da micropropagação desta espécie, o tratamento indicado seria o MS + 1 μM ANA por apresentar maior número de brotos por explante, considerando esta a variável de maior relevância para o processo.

Palavras-chave: Micropropagação, Explante Foliar, Brotação, Bromélia, ANA e BAP.

ABSTRACT

Bromeliads are an important group for the maintenance of the Atlantic Forest, with many threatened species due, mainly, to exacerbated extraction and destruction of their natural habitats. Seen the need of developing protocols for the conservation of these species, the aim of this study was to test the effect of different concentrations of NAA and BA in the *in vitro* induction of shoots of *Billbergia euphemiae*. Seedlings grown *in vitro* had their leaves removed after 42 days and inoculated on Petri dishes with MS medium containing different combinations of NAA (0; 1 and 2 μM) and BA (0; 2; 4 and 6 μM) plus sucrose (30g. L^{-1}) and agar (7g.L^{-1}). The experiment was conducted in a factorial 3x4 (NAA x BA) in completely randomized design with 6 repetitions, each repetition consisting of a Petri dish with five explants. Evaluations were made at 30 and 60 days of cultivation. The best results for number of shoots per explant and shoot length were observed in MS + 1 μM NAA and MS + 6 μM BA with 60 days of cultivation. The average number of leaves was higher with the treatment MS + 1 μM NAA. The presence of BA was not significant for this parameter. The interaction of MS + 1 μM NAA in absence of BA showed the best value for the longest leaf, with no significant difference between the interaction of MS + 1 μM NAA + 2 μM BA. This study allowed determining the *in vitro* conditions for the induction of shoots from leaf explants of the bromeliad *B. euphemiae*. For practical application of micropropagation of this species, the indicated treatment would be MS + 1 μM NAA, due to its higher number of shoots per explant, considering this variable the most relevant for the process.

Keywords: Micropropagation, Leaf Explants, Shoots, Bromeliad, NAA and BA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Billbergia euphemiae</i>	14
Figura 2 - Indução de brotos de <i>B. euphemiae</i>	21
Figura 3 - Explantes foliares inoculados em meio MS suplementado com 2 μ M de ANA e 6 μ M de BAP.	20
Figura 4 - Efeito de BAP na indução de brotos de <i>B. euphemiae</i>	24
Figura 5 - Explantes inoculados em meio MS contendo 1 μ M de ANA e 2 μ M de BAP.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito das diferentes concentrações de ANA e BAP sobre a porcentagem de explantes responsivos, explantes senescentes, formação de raízes e na formação de calos de <i>B. euphemiae</i> após 30 e 60 dias de cultivo.	19
Tabela 2 - Análise de variância para o comprimento da brotação (CB), comprimento médio da maior folha (CMF), número de brotos por explante (NBE) e número médio de folhas (NMF) de <i>B. euphemiae</i> , aos 30 e 60 dias de cultivo em meio MS suplementado com ANA (F1) e BAP (F2).	22
Tabela 3 - Efeito de ANA sobre o número de brotos por explante (NBE), comprimento da brotação (CB), número médio de folhas (NMF) de <i>B. euphemiae</i> aos 30 e 60 dias de cultivo em meio MS.	22
Tabela 4 - Efeito de BAP sobre o número de brotos por explante (NBE), comprimento da brotação (CB), número médio de folhas (NMF) de <i>B. euphemiae</i> aos 30 e 60 dias de cultivo em meio MS.	23
Tabela 5 - Efeito de ANA e BAP sobre o comprimento médio da maior folha (CMF) de <i>B. euphemiae</i> aos 30 dias de cultivo em meio MS.	25
Tabela 6 - Efeito de ANA e BAP sobre o comprimento médio da maior folha (CMF) de <i>B. euphemiae</i> , aos 60 dias de cultivo.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANA Ácido Naftalenoacético
- BAP 6-Benzilaminopurina
- CB Comprimento da brotação
- CMF Comprimento médio de folhas por explante
- NBE Número de brotos por explante
- NMF Número médio de folhas por explante

. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é uma das mais importantes florestas tropicais do mundo por ser um bioma de alta diversidade genética, apresentando cerca de 20.000 espécies vegetais, sendo 40% endêmicas da região. Extremamente heterogênea em sua composição, estende-se de 4° a 32° S e cobre um amplo rol de zonas climáticas e formações vegetacionais, de tropicais a subtropicais (TABARELLI et al, 2005).

Os fragmentos remanescentes formam aproximadamente 7,91% da Floresta Atlântica original, compondo o ecossistema mais ameaçado do Brasil, que serve de refúgio para diversas espécies (MARTINELLI, 2000; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2009). A maioria das espécies oficialmente ameaçadas de extinção no Brasil habita este bioma. Atualmente, mais de 530 espécies de plantas, aves, mamíferos, répteis e anfíbios estão ameaçados; algumas espécies, nacionalmente e, as endêmicas, globalmente (TABARELLI et al., 2003; TABARELLI et al., 2005).

A distribuição de espécies ameaçadas não é homogênea em toda a Floresta Atlântica. O maior número de espécies ameaçadas estão nas florestas baixo-montana que ligam os estados da Bahia e do Espírito Santo e também nas florestas montana compartilhada pelos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Estas regiões também possuem relatos de possuir o maior número de espécies endêmicas (TABARELLI et al., 2003). Dentre estas, encontram-se as bromélias, pertencentes à família Bromeliaceae, as quais, pela fragmentação deste ecossistema e em função de seu valor ornamental foram, ao longo do tempo, extraídas desordenadamente de seus habitats naturais (DAL VESCO, 2010).

A família Bromeliaceae possui 58 gêneros e 3172 espécies (LUTHER, 2008). Mais de 50% destas espécies são epífitas, isto é, suas raízes podem se fixar em troncos de árvores, pedras ou outros substratos, podendo absorver umidade do ar ou do orvalho ao invés do solo (MARTINELLI, 2000). Podem ocorrer também em formas terrestres, terrestres ocasionais, rupícolas e saxícolas (NUNES, 2002).

Atualmente está dividida em oito subfamílias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Bromelioideae (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2009).

As bromélias são plantas perenes que apresentam uma grande variação nas formas, cores e tamanhos. São encontradas nos mais diversos ambientes, desde o nível do mar às mais elevadas altitudes como a cordilheira dos Andes; em regiões úmidas como a Floresta Atlântica ou áridas como a Caatinga (NUNES, 2002).

A maior diversidade de espécies de bromeliáceas encontra-se na América do Sul, estimando-se que 40% das espécies e 73% dos gêneros ocorram no Brasil. A costa leste do Brasil e o escudo das Guianas são considerados os dois centros de diversidade da família Bromeliaceae, sendo a Floresta Atlântica considerada um destes centros, e vários de seus gêneros e espécies são endêmicos deste ecossistema (RECH FILHO, 2004).

As bromélias possuem folhas vistosas, com coloração, forma e tamanhos muito variados. São espiraladas, com bainhas amplas e flexíveis, que formam um recipiente designado cisterna, onde ocorre o acúmulo de água e detritos orgânicos, podendo servir como habitat para pequenos animais e outros microrganismos. Estes, por sua vez, servem como alimento para outros animais, incluindo muitos pássaros e alguns primatas, como o mico-leão-dourado em extinção (NUNES, 2002, MARTINELLI, 2000).

A subfamília Bromelioideae inclui 29 gêneros e cerca de 760 espécies (BENZING, 2000) concentradas principalmente na Mata Atlântica (MARTINELLI et al., 2008). Constituída por plantas terrestres, rupícolas e epífitas, geralmente herbáceas, variando de plantas delicadas e de pequeno porte até plantas de grande porte (MOREIRA, 2008). Nesta subfamília se encontram os gêneros *Aechmea*, *Ananas*, *Billbergia*, *Canistrum*, *Nidularium* e *Quesnata*, além do gênero *Bromelia*, que serviu de base para a descrição da família e da subfamília (ROCHA, 2010).

Geralmente vistas como plantas de interesse ornamental, as bromélias apresentam grande diversidade de espécies das mais variadas formas e cores. Sob esse ponto de vista, são responsáveis por um volume comercial significativo.

A importância econômica das bromélias tem como destaque o fruto do abacaxi, *Ananas comosus* (L.) Merrill, muito utilizado na alimentação, como na produção de sucos, doces e sobremesas. Outro aspecto de sua importância econômica é na produção de fibras, como no caso do “caroá-verdadeiro” -*Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez. Na medicina natural, as bromélias tem importância na utilização da enzima “bromelina”, com atividade depurativa e digestiva, presente em algumas espécies do gênero *Bromelia*. (MOREIRA et al., 2006; MOREIRA, 2008). Por estas características, muitas espécies se tornam vulneráveis ao extrativismo.

O gênero *Billbergia* Thunb., com 64 espécies e 26 variedades (LUTHER, 2008), está distribuído desde a América Central até o sul da América Meridional. Os dois subgêneros, *Billbergia* e *Helicodea* Lem., apresentam um padrão disjunto de distribuição, sendo a Floresta Atlântica o centro de diversidade para o primeiro e a Floresta Amazônica, o centro de diversidade para o segundo (BARROS; COSTA, 2008).

A espécie *Billbergia euphemiae* E. Morren distribui-se pelos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, podendo ser encontrada em vegetações de Florestas Ombrófilas Densas, Florestas Estacionais Semidecíduais e Restinga (BARROS; COSTA, 2008; MARTINELLI et al., 2009). É caracterizada pelo indumento alvo flocoso no escapo, na raque, nas sépalas e no ovário, pelas brácteas do escapo congestionadas na base da inflorescência e geralmente estramíneas na antese, pelas flores zigomorfas, patentes a reflexas, pelo ovário liso a pouco sulcado e pelo padrão de cores das flores (BARROS; COSTA, 2008).



Figura 1 - *Billbergia euphemiae*. (Foto: FAVORETO, 2010)

A fim de atenuar os problemas causados pela devastação da Floresta Atlântica, e pelo extrativismo de espécies ornamentais, se faz necessário o desenvolvimento de estratégias para a propagação e conservação de espécies nativas, para que não ocorra um cenário de erosão genética irreversível (MOREIRA, 2008).

A Cultura de tecidos é uma ferramenta utilizada na propagação vegetal em larga escala (BENCKE; DROSTE, 2008). As técnicas de cultivo *in vitro* constituíram-se num importante conjunto de tecnologias na área da Biologia vegetal, auxiliando na utilização e conservação dos recursos genéticos vegetais nas últimas décadas (WITHERS; WILLIAMS, 1998). A utilização destas técnicas, associadas à micropropagação, resultam na obtenção de mudas uniformes, de alta qualidade e livres de doenças, permitindo a rápida multiplicação, preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção (RECH FILHO, 2004).

A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa *in vitro* assim denominada devido ao tamanho dos propágulos utilizados, e tem sido considerada uma técnica importante

para aumentar e aperfeiçoar a produção de bromélias de modo a atender o mercado consumidor de plantas ornamentais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ROCHA, 2010). A utilização comercial da micropropagação é uma realidade em diversos países do mundo, com destaque para a Europa Ocidental, Estados Unidos e Brasil, onde é importante principalmente para a limpeza clonal e multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas (KANASHIRO et al., 2007).

Em bromélias, a propagação clonal por divisão natural de brotações laterais é de baixa frequência, originando poucos indivíduos por planta por ano; já a propagação *in vitro* proporciona o desenvolvimento de protocolos para a propagação massal e conservação do germoplasma, que podem ser utilizados em escala comercial, diminuindo a pressão de extração destas espécies do seu habitat natural (RECH FILHO, 2004).

Trabalhos com propagação *in vitro* de bromélias têm sido desenvolvidos a partir de diversos explantes, como sementes (GALVANESE et al., 2007; BENCKE; DROSTE, 2008), segmentos caulinares (ROCHA, 2010), meristemas radiculares (POMPELLI; GUERRA, 2005) e folhas (KOH; DAVIES JR, 1997; CARNEIRO et al., 1999; SILVA et al., 2009; DAL VESCO, 2010).

Em bromélias, as respostas morfogênicas *in vitro* a partir de diferentes fontes de explantes estão geralmente associadas com a organogênese, levando à produção de brotos e/ou raízes (CARNEIRO et al., 1999).

Na Cultura *in vitro* de tecidos vegetais alguns fatores são considerados importantes. Os meios de cultura são enriquecidos com vitaminas e sais minerais, e na maioria das vezes, utilizam-se reguladores de crescimento vegetal. A adição destes reguladores tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Simultaneamente, a adição de reguladores estimula certas respostas como alongamento ou multiplicações da parte aérea (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 2006). A composição e concentração de reguladores de crescimento no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultivo *in vitro*, sendo auxinas e citocininas as classes mais utilizadas. (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 2006).

As citocininas são conhecidas por regular a divisão celular das partes aéreas nos vegetais e promover o crescimento de gemas laterais (TAIZ; ZEIGER, 2006). Das citocininas comercialmente disponíveis, 6-benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, apresenta melhores resultados. As concentrações de citocininas podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 2006).

As auxinas são utilizadas para estimular o crescimento das partes aéreas, o enraizamento do explante inicial e a manutenção de um caule único com dominância apical num sistema onde novos segmentos nodais sejam desejados como forma de multiplicação. O ácido naftalenacético (ANA), se adicionado em concentrações acima de alguns décimos de miligrama, tende a estimular formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 2006).

A utilização de explantes foliares para o processo de micropropagação utilizando combinações de citocininas e auxinas foi descrita para diversas espécies de bromélias, como *Cryptanthus* (KOH; DAVIES JR, 1997), *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith (CARNEIRO et al., 1999), *Vriesea reitzii* (RECH FILHO et al., 2001; ALVES et al., 2006) e *Vriesea scalaris* (SILVA et al., 2009).

Visto a importância econômica e ecológica das bromélias, a intensa degradação de seus habitats naturais, levando a extinção de diversas espécies e o sucesso de protocolos de propagação *in vitro* de importantes espécies de bromeliáceas, se faz necessário estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* para *Billbergia euphemiae* E. Morren, visando a conservação *in vitro* da espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes combinações de ANA e BAP sobre o desenvolvimento *in vitro* de brotos de *B. euphemiae*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a germinação *in vitro* de sementes de *B. euphemiae*;
- Avaliar o efeito de diferentes combinações de ANA e BAP sobre a indução de brotos em explantes foliares de *B. euphemiae*, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre – ES.

Frutos maduros de *B. euphemiae* foram coletados de indivíduos localizados no Distrito de Burarama, município de Cachoeiro de Itapemirim, nas coordenadas geográficas 20°41'S41°21'W, e secos ao ar livre, em local sombreado, por sete dias, para completarem sua deiscência e facilitar a extração das sementes. Uma vez extraídas, as sementes foram armazenadas em embalagens de papel filtro em geladeira até o uso.

O voucher do espécime-testemunho de *B. euphemiae* E. Morren foi depositado no herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, sob o número CESJ 55660.

Para a montagem do experimento foi criado um *bulk* de sementes, em que 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 *B. euphemiae* 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.

Em condições assépticas em fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas por um minuto em álcool 70%, posteriormente em hipoclorito de sódio comercial por cinco minutos e enxaguadas em água destilada estéril por três vezes. Este processo foi repetido por duas vezes e então as sementes foram colocadas em papel filtro até o momento da inoculação.

As sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹) e ágar (7 g.L⁻¹), e mantidas em sala de cultivo sob iluminação artificial com luz branca (fluorescente), com fluência de 1,6 W/m², fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C.

Folhas de aproximadamente 1 cm de tamanho foram retiradas de plântulas estabelecidas *in vitro* com 42 dias, e inoculadas com a face abaxial em contato com o meio. Foi utilizado o meio MS com diferentes concentrações dos reguladores de ANA (0, 1 e 2 µM) e BAP (0, 2, 4 e 6 µM). As condições de cultivo da sala de crescimento também foram ajustadas para temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo 16 horas de luz branca (fluorescente), com fluência de 1,6 W/m².

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3x4 (3 concentrações de ANA e 4 concentrações de BAP) com seis repetições, em delineamento experimental inteiramente

casualizado (DIC). A unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri contendo cinco explantes.

As culturas foram avaliadas aos 30 e 60 dias após a inoculação dos explantes foliares para mensurar as variáveis: porcentagem do número de explantes responsivos, número de explantes senescentes, formação de calos, formação de raiz, número de brotações por explante (NBE), comprimento das brotações (CB), comprimento médio da maior folha (CMF) e número médio de folhas por broto (NF). Para a contagem do número de brotos por explante e número de folhas foi utilizado microscópio estereoscópico e para mensurar o comprimento da brotação e o comprimento da maior folha foi utilizado um paquímetro.

Os explantes responsivos foram classificados como aqueles que apresentaram algum tipo de resposta, direta ou indireta, com a formação de brotos, folhas, raízes e calos. Explantes senescentes foram classificados como aqueles que apresentaram coloração amarela ou marrom e/ou necrose no tecido.

Os dados foram submetidos à análise de variância, com médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.6 beta (2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma taxa de 100% de germinação das sementes de *B. euphemiae* em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento, livre de agentes contaminantes como bactérias e fungos, confirmando a eficiência do protocolo de desinfestação utilizado.

O maior número de explantes responsivos foi observado no tratamento MS + 2 μ M ANA combinado com 6 μ M BAP, assim como a maior taxa de formação de calos (Tabela 1 e Figura 2). Para o número de explantes responsivos, este meio apresentou 70% de resposta aos 30 dias, aumentando essa taxa para 87% aos 60 dias. Foi observada a formação de calos em 63% e 87% dos explantes, respectivamente, aos 30 e 60 dias de cultivo. As citocininas, quando combinadas em uma concentração adequada com auxinas, promovem intensa divisão celular, formando calos em *B. euphemiae*.

Tabela 1 - Efeito das diferentes concentrações de ANA e BAP sobre a porcentagem de explantes responsivos, explantes senescentes, formação de raízes e na formação de calos de *B. euphemiae* após 30 e 60 dias de cultivo.

Tratamentos	Explantes Responsivos		Explantes senescentes		Formação de raiz		Formação de calo	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
MS0	0%	0%	20%	37%	0%	0%	0%	0%
MS + 1 μ M ANA	37%	43%	0%	33%	33%	33%	13%	13%
MS + 2 μ M ANA	20%	30%	0%	33%	47%	47%	20%	30%
MS + 2 μ M BAP	50%	53%	0%	33%	0%	0%	47%	47%
MS + 4 μ M BAP	30%	33%	10%	20%	0%	0%	13%	20%
MS + 6 μ M BAP	47%	50%	13%	33%	0%	0%	40%	43%
MS + 1 μ M ANA + 2 μ M BAP	50%	50%	17%	37%	0%	0%	23%	23%
MS + 1 μ M ANA + 4 μ M BAP	47%	57%	7%	23%	0%	0%	27%	47%
MS + 1 μ M ANA + 6 μ M BAP	53%	60%	10%	23%	0%	0%	37%	60%
MS + 2 μ M ANA + 2 μ M BAP	50%	53%	0%	23%	0%	0%	20%	37%
MS + 2 μ M ANA + 4 μ M BAP	63%	83%	0%	33%	0%	0%	50%	83%
MS + 2 μ M ANA + 6 μ M BAP	70%	87%	13%	20%	0%	0%	63%	87%

Alguns explantes permaneceram vivos durante todo o experimento, sem sinais de senescência, entretanto, também não apresentaram qualquer padrão de resposta morfogênica, como formação de calos, raízes ou brotos.

A formação de raiz foi observada somente nos meios MS + 1 μ M ANA e MS + 2 μ M ANA (Tabela 1 e Figura 3B-E). A maior taxa foi observada no tratamento MS + 2 μ M ANA, com 47% de formação de raízes tanto em 30 quanto em 60 dias de cultivo. A utilização de

ANA em diferentes concentrações para promover enraizamento em bromélias vem sendo relatada com sucesso em diversos trabalhos (PIERIK et al.; 1984; MORAN et al., 2003; ALVES et al., 2006; HUANG et al., 2011).

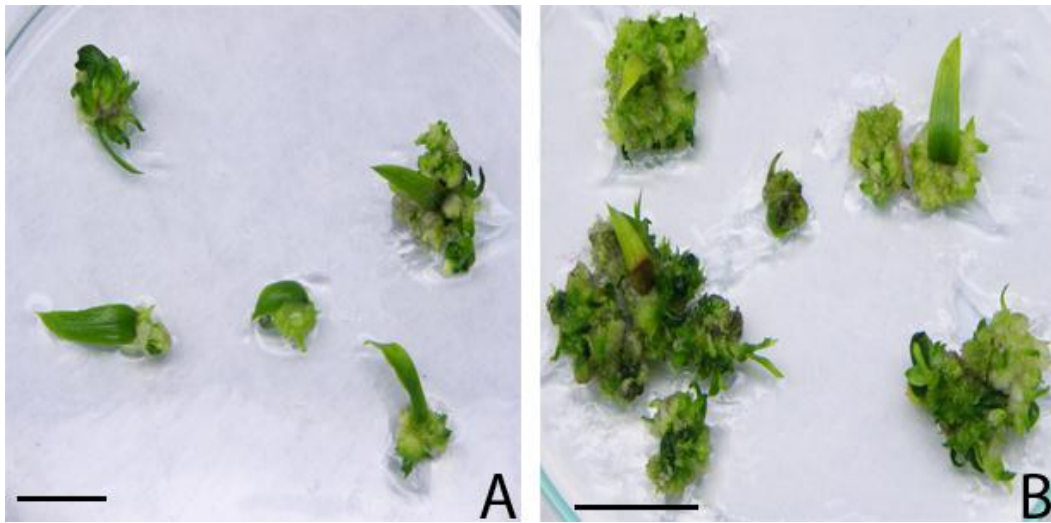


Figura 2 - Explantes foliares inoculados em meio MS suplementado com 2 μM de ANA e 6 μM de BAP. **A** - Explantes aos 30 dias. **B** - Explantes aos 60 dias. (Barra = 1cm).

Assim como apresentado aqui para *B. euphemiae*, Pardo et al (2008) mostraram que a presença de ANA é importante para o enraizamento de *Billbergia rosea*, obtendo um aumento no número de raízes à medida que se aumentou a concentração de ANA de 0,5 para 5,37 μM em meio MS. Entretanto, o comprimento da raiz foi inversamente proporcional, com os maiores tamanhos (3,43 cm) sendo observados nas concentrações mais baixas deste regulador (0,5 μM).

O tratamento controle (MS0) apresentou a maior taxa de explantes senescentes em ambas as avaliações (Tabela 1 e Figura 3A). Este fato pode ser explicado pela própria ausência de reguladores no meio, uma vez que o explante se encontra isolado de uma fonte de hormônios, levando a degeneração do tecido.

A formação de brotos foi observada apenas na base dos explantes foliares de *B. euphemiae* em todos os tratamentos com os reguladores ANA e BAP. Este padrão foi descrito por Hosoki e Asahira (1980), mostrando que a região basal de folhas de bromélias apresenta elementos vasculares que podem conter células competentes para rediferenciação quando ativadas por reguladores de crescimento. Trabalhos anteriores também apresentaram esse padrão para diferentes espécies de bromélias, como Mercier e Kerbauy (1997), Carneiro et al. (1999), Pompelli e Guerra (2005) e Alves et al. (2006). Assim, a utilização de explantes contendo segmentos da região basal de folhas é eficiente na regeneração de bromélias para a micropropagação.

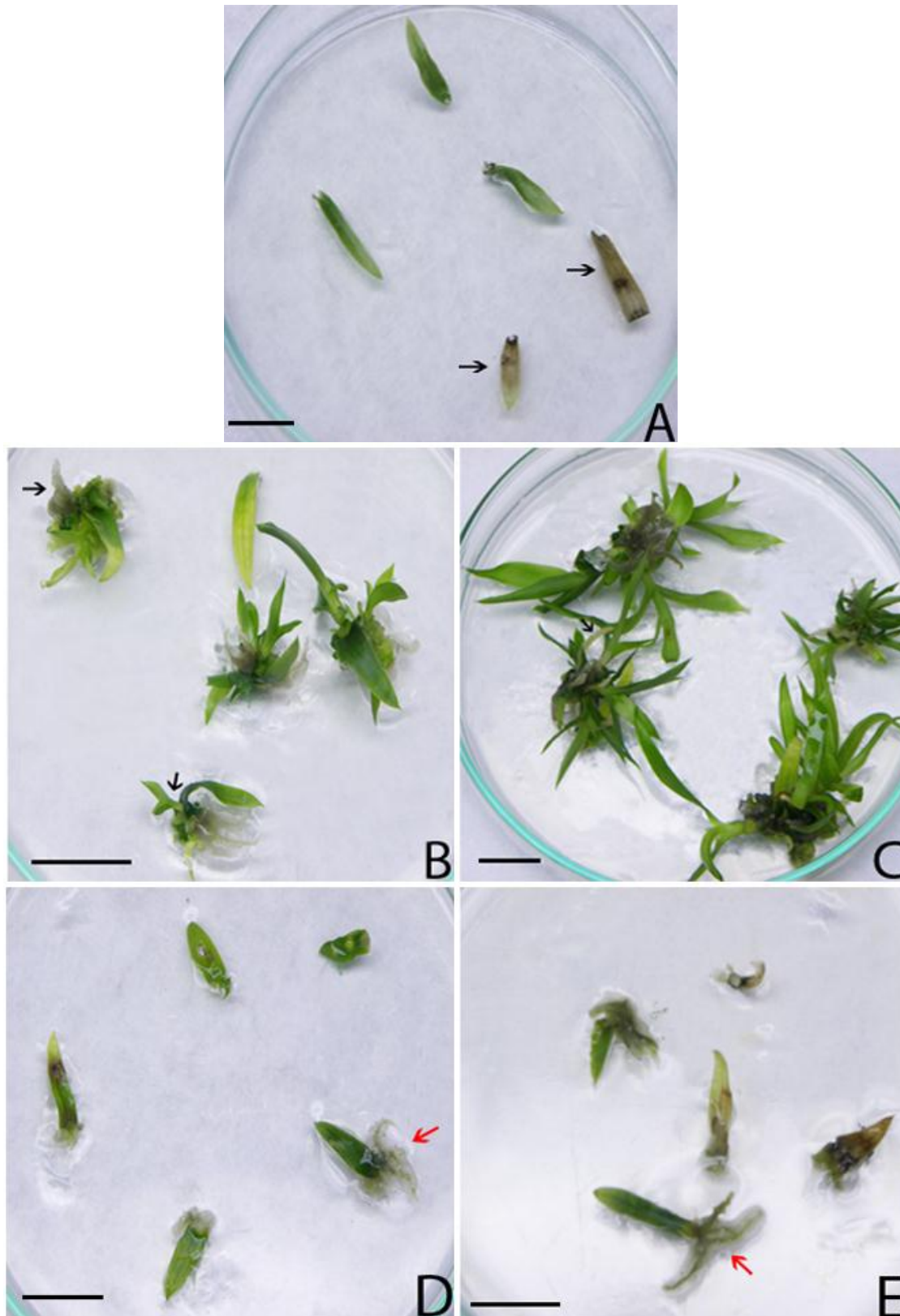


Figura 3 - Indução de brotos de *B. euphemiae*. **A** - Explantes senescentes (setas) observados no meio MSO aos 30 dias. **B-E** - Explantes responsivos. **B** - Meio suplementado com 1 μM de ANA, aos 30 dias. **C** - Meio MS suplementado com 1 μM de ANA, aos 60 dias. **D** - Meio suplementado com 2 μM de ANA aos 30 dias. **E** - Meio suplementado com 2 μM de ANA aos 60 dias. Seta vermelha indica formação de raiz; seta azul indica formação de brotos. (Barra = 1 cm).

Os resultados da análise de variância mostraram que os fatores ANA e BAP só apresentaram interação significativa com a variável CMF aos 60 dias (Tabela 2). Para os demais parâmetros (CB, NBE, NMF e CMF - 30 dias) não foi observada uma interação significativa entre os dois fatores analisados.

Tabela 2 - Análise de variância para o comprimento da brotação (CB), comprimento médio da maior folha (CMF), número de brotos por explante (NBE) e número médio de folhas (NMF) de *B. euphemiae*, aos 30 e 60 dias de cultivo em meio MS suplementado com ANA (F1) e BAP (F2).

Fatores	CB		CMF		NBE		NMF	
	30 Dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
ANA	5.9270 **	12.8430 **	3.9225 *	11.5270 **	8.1168 **	6.4062 **	2.9532 ns	14.9510 **
BAP	7.5360 **	5.4912 **	2.8541 *	6.1259 **	6.8746 **	6.7893 **	1.8296 ns	6.5353 **
Int. F1 x F2	1.5008 ns	2.2346 ns	0.9250 ns	4.4687 **	0.5230 ns	0.4569 ns	0.4500 ns	3.4583 ns

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$), ns não significativo ($p \geq .05$)

O efeito de ANA sobre as variáveis NBE, CB e NMF está representado na Tabela 3. Os melhores resultados para NBE foram obtidos aos 60 dias, com as concentrações de 1 e 2 μM , respectivamente, sem diferenças estatísticas significativas entre si em ambas avaliações. O tratamento MS + 1 μM ANA apresentou média de 16,39 brotos por explante aos 60 dias, enquanto o tratamento contendo 2 μM obteve média de 10,69 brotos por explante nessa mesma avaliação. Esta última concentração, também não diferiu significativamente do controle.

Tabela 3 - Efeito de ANA sobre o número de brotos por explante (NBE), comprimento da brotação (CB), número médio de folhas (NMF) de *B. euphemiae* aos 30 e 60 dias de cultivo em meio MS.

Tratamentos	NBE		CB		NMF	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
MS + 0 μM ANA	2.35833 b	6.23833 b	0,22292 b	0,44958 b	0.15208 a	1.33333 b
MS + 1 μM ANA	6.98333 a	16.39333 a	0,45792 a	1,08542 a	0.39167 a	5.53833 a
MS + 2 μM ANA	4.82500 ab	10.69167 ab	0,33250 ab	0,66458 b	0.05000 a	1.16042 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

Para as variáveis CB e NMF, os melhores resultados foram observados no tratamento MS + 1 μM ANA (Tabela 3 e Figura 2), aos 30 e 60 dias, também não diferindo estatisticamente da concentração de 2 μM aos 30 dias.

Rech Filho et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes na multiplicação de brotos de *Vriesea reiztii* utilizando concentrações de 1 μM ANA combinado com 2 μM BAP em meio MS, com uma taxa de proliferação de 20 brotos por explante.

Paiva et al (2009) mostraram que em *Nidularium fulgens*, o tratamento com meio MS suplementado com 2,6 μM ANA na ausência de BAP apresentou maior comprimento dos brotos (1,85 cm) após 120 dias de cultivo. De acordo com Pierik et al. (1984), o regulador ANA, quando adicionado ao meio de cultura MS em concentrações entre 2,6 e 4,2 μM , foi eficiente para promover enraizamento e o crescimento dos brotos em três diferentes espécies de bromeliáceas (*Guzmania minor*, *G. lingulata* e *Vriesea splendens*).

Provavelmente para a espécie *B. euphemiae*, a concentração endógena de ANA é suficiente para estimular as respostas, uma vez que o maior número e maior comprimento dos brotos foram observados utilizando apenas 1 μM deste regulador.

A tabela 4 mostra os resultados do efeito de BAP sobre as variáveis NBE, CB e NMF. Os melhores resultados foram observados nos tratamentos com BAP (Figura 4) em relação ao controle, mas sem diferenças estatísticas entre as concentrações testadas, aos 30 e 60 dias de cultivo. Possivelmente os teores endógenos de BAP em *B. euphemiae* poderiam ser mais elevados, não sendo necessária uma alta concentração exógena deste regulador para se obter respostas.

Tabela 4 - Efeito de BAP sobre o número de brotos por explante (NBE), comprimento da brotação (CB), número médio de folhas (NMF) de *B. euphemiae* aos 30 e 60 dias de cultivo em meio MS.

Tratamentos	NBE		CB		NMF	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
MS + 0 μM BAP	1.17778 b	2.48889 b	0.12278 b	0.37056 b	0.13333 a	2.60000 ab
MS + 2 μM BAP	5.38889 a	11.31778 a	0.42000 a	0.83611 a	0.43611 a	5.35611 a
MS + 4 μM BAP	5.45556 a	15.03111 a	0.33889 a	0.82389 a	0.10000 a	1.67778 b
MS + 6 μM BAP	6.86667 a	15.59333 a	0.46944 a	0.90222 a	0.12222 a	1.07556 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

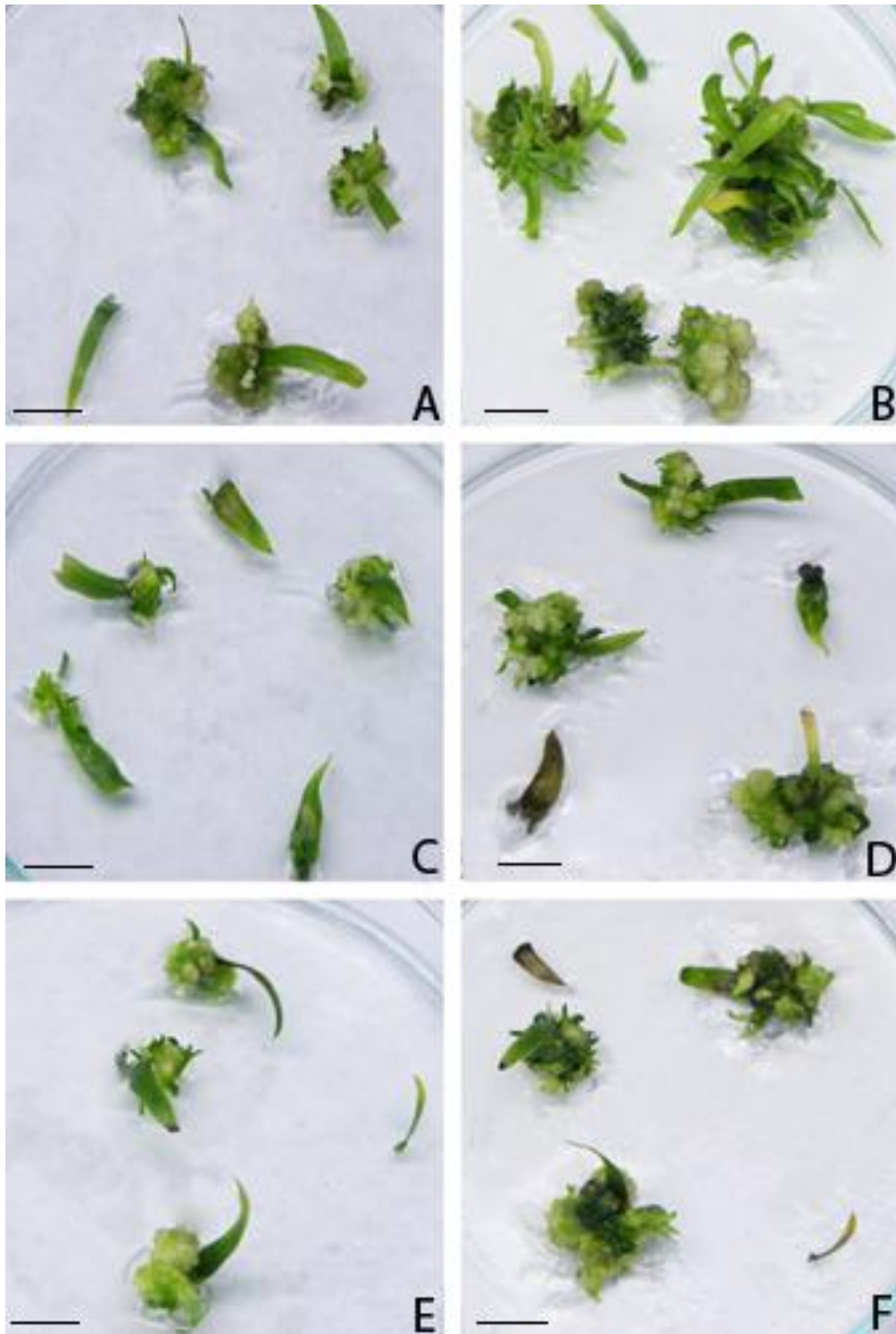


Figura 2 - Efeito de BAP na indução de brotos de *B. euphemiae*. **A** - Explantes inoculados em meio MS suplementado com 2 μM de BAP, aos 30 dias. **B** - Meio MS suplementado com 2 μM de BAP, aos 60 dias. **C** - Meio MS suplementado com 4 μM de BAP, aos 30 dias. **D** - Meio MS suplementado com 4 μM de BAP, aos 60 dias. **E** - Meio MS suplementado com 6 μM de BAP, aos 30 dias. **F** - Meio MS suplementado com 6 μM de BAP, aos 60 dias. (Barra = 1cm).

A análise de NMF mostrou não haver diferenças estatísticas entre os tratamentos aos 30 dias e entre o tratamento com 2 μM e o controle, aos 60 dias (Tabela 4). Provavelmente, para *B.*

euphemiae, a adição de BAP no meio de cultura não seria necessária para o desenvolvimento de folhas.

Mendes et al. (2007) mostraram que a presença de 5, 10 e 15 μM de BAP em meio MS promoveu um aumento significativo no número de brotos em *Billbergia distachia*, indicando que esta citocinina é responsável pela multiplicação *in vitro* desta espécie. Para *B. rosea*, Pardo et al. (2008) relataram a maior média de brotos (19,30) e maior comprimento da brotação (4,75 cm) utilizando 4,44 μM de BAP e 2,6 μM de ANA em meio MS. Lima et al. (2011) encontraram média de 3,05 folhas por broto em *Billbergia porteana*, utilizando meio MS acrescido de 2,5 μM BAP + 0,5 μM ANA, mas sem diferença estatística entre o controle (3,60). Este mesmo padrão de resposta foi observado no presente trabalho com *B. euphemiae*, onde o NMF não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

A variável comprimento da maior folha não sofreu influência de ANA aos 30 dias de cultivo, uma vez que as maiores médias observadas na concentração de 1 μM não diferiram significativamente em relação ao controle. Para o BAP no houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito de ANA e BAP sobre o comprimento médio da maior folha (CMF) de *B. euphemiae* aos 30 dias de cultivo em meio MS.

Tratamentos	ANA			BAP			
	0 μM	1 μM	2 μM	0 μM	2 μM	4 μM	6 μM
CMF	0.02958 ab	0.07917 a	0.02167 b	0.02944 a	0.08889 a	0.03389 a	0.02167 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

Estes resultados indicam que a adição de ANA e BAP no meio de cultura não influenciou o comprimento das folhas aos 30 dias de cultivo, provavelmente devido a um nível endógeno satisfatório destes hormônios ainda presente nos explantes. Resultado semelhante foi relatado por Lima et al. (2011) para *B. porteana*, obtendo média de 2,07 cm em meio MS sem adição de reguladores, com os demais tratamentos utilizando ANA e BAP apresentando média inferior a 1,4 cm.

Foi possível observar, entretanto, que aos 60 dias houve interação significativa entre ANA e BAP para a variável CMF (Tabela 6). O maior valor foi observado na interação de 1 μM ANA com ausência de BAP (0,560 cm) em meio MS, em que dentro do nível 0 μM de BAP a concentração de 1 μM ANA diferiu estatisticamente de 0 e 2 μM ANA. Dentro do nível 1 μM de

ANA, as concentrações de 0 e 2 μM de BAP (0,560 e 0,458, respectivamente) foram significativamente diferentes as de 4 e 6 μM de BAP (0,180 e 0,085, respectivamente) (Figura 5).

Como já citado acima, alguns trabalhos relatam o papel de ANA no desenvolvimento das partes aéreas em bromélias (Pierik et al. 1984; Paiva et al., 2009). As citocininas, em geral, promovem a divisão celular das partes aéreas. Provavelmente a combinação destes dois fatores tenha levado a um maior crescimento das folhas em *B. euphemiae*.

Tabela 6 - Efeito de ANA e BAP sobre o comprimento médio da maior folha (CMF) de *B. euphemiae*, aos 60 dias de cultivo.

ANA	CMF			
	BAP			
	0 μM	2 μM	4 μM	6 μM
0 μM	0.0000 bB	0.3067 abA	0.0000 aB	0.1067 aAB
1 μM	0.5600 aA	0.4583 aA	0.1800 aB	0.0850 aB
2 μM	0.0000 bA	0.2033 bA	0.1283 aA	0.1250 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

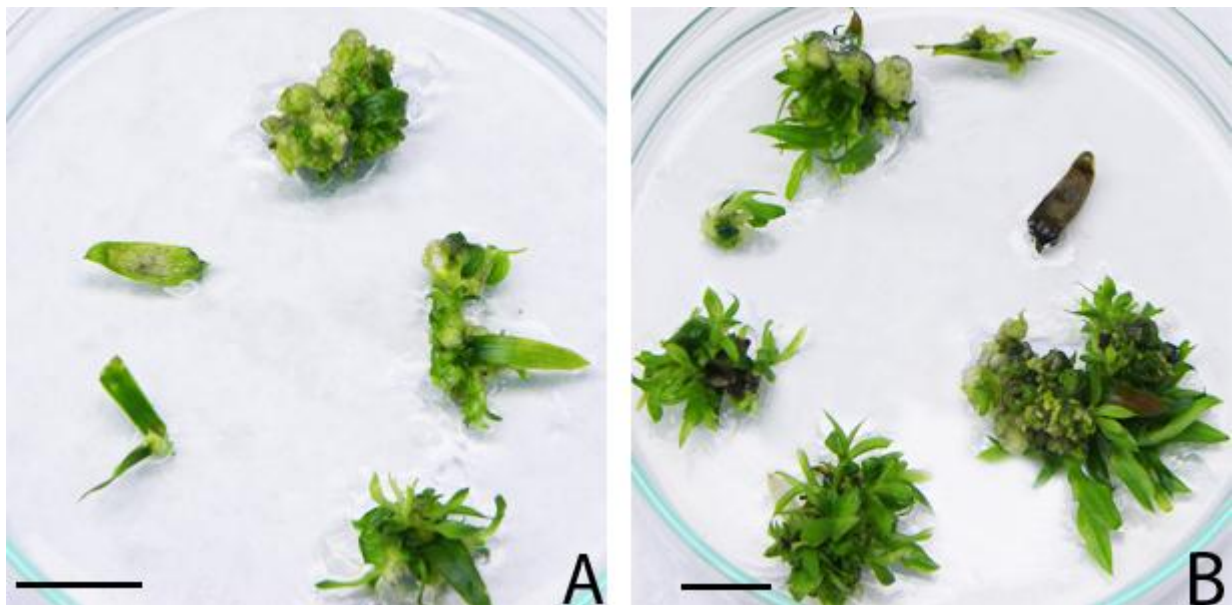


Figura 3 - Explantes inoculados em meio MS contendo 1 μM de ANA e 2 μM de BAP. **A** - Aos 30 dias de cultivo. **B** - Aos 60 dias de cultivo. (Barra = 1cm).

5. CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível estabelecer um protocolo para a indução de brotos de *B. euphemiae* usando explantes foliares. A organogênese foi observada apenas na base dos explantes foliares quando inoculados em meios com ANA e BAP, mesmo sem haver interação significativa entre eles. A utilização destes hormônios se mostrou eficiente na diferenciação dos explantes de *B. euphemiae*.

A concentração de 1 μM ANA em meio MS favoreceu o maior número de brotos por explante, com média de 16,39 aos 60 dias, sem diferenciar estatisticamente da concentração de 2 μM , nos dois períodos de avaliação. Aos 60 dias, este mesmo tratamento apresentou maior comprimento da brotação, com média de 1,08 cm. Nos tratamentos com BAP foram observados os melhores resultados para o número de brotos e comprimento da brotação em relação ao controle sem este regulador, em ambas as avaliações.

Para o número de folhas observado por explantes, os resultados foram significativos somente aos 60 dias, onde o tratamento MS + 1 μM ANA apresentou a maior média (5,53). A presença do BAP para induzir o desenvolvimento de folhas não se fez necessária, uma vez que a maior média obtida utilizando 2 μM (5,35) não divergiu significativamente do tratamento controle.

A combinação de 1 μM ANA com ausência de BAP em meio MS apresentou o melhor valor para o comprimento da maior folha, com média de 0,56 cm, sem diferenciar estatisticamente da interação entre MS + 1 μM ANA e MS + 2 μM BAP (0,458 cm).

Para uma aplicação prática da micropropagação desta espécie, o tratamento indicado seria o MS + 1 μM ANA por apresentar maior número de brotos por explante, considerando esta a variável de maior relevância para o processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. M.; DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v.110, p. 204–207. 2006.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, p.105-121. 2009.
- BARROS, J. V.; COSTA, A. F. O gênero *Billbergia* Thunb. (Bromeliaceae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v. 22, n. 4, p. 1172-1192. 2008.
- 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.
- BENZING, D.H. **Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation**. Cambridge University Press, Cambridge. 2000.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, v. 1, p. 87-132. 2006.
- CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G; BRITO, C. J. M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 79-83. 1999.
- 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. Tese (Doutorado em Ciências - Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, SC. 2010.

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

FAVORETO, F. C. **Bromeliaceae do Distrito de Burarama (Cachoeiro de Itapemirim, Es, Brasil)**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Alegre, ES. 2010.

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 agar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia native da Mata Atlântica. **Ceres**, v. 54, n. 311, p. 63-67. 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Cap.9, p.99-170. 2006.

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience**, v. 15, n. 5, p. 603-604. 1980.

HUANG, P. L.; LIU, Z.; CHANG, M.; LIAO, L. Micropropagation of the bromeliad *Guzmania* 'Hilda' via organogenesis and the effect of α -naphthaleneacetic acid on plantlet elongation. **Scientia Horticulturae**, 2011. doi:10.1016/j.scienta.2011.08.035

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**. v. 34, n. 1, p.59-66. 2007.

KOH, Y. C.; DAVIES JR., F. T. Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. **Scientia Horticulturae**, v. 70, p. 301-307. 1997.

LIMA, M. A. DE; JÚNIOR, L. A. C.; SOUSA, K. C. I.; JÚNIOR, V. DE A. P.; CARNEIRO, M. DE F.; SIBOV, S. T. Germinação *in vitro* e avaliação do desenvolvimento de plântulas de

Billbergia porteana brong. Ex beer (Bromeliaceae). In: Reunião Anual da SBPC, 63., 2011, Goiania. **Anais...** Goiania: UFG. 2011.

LUTHER, H. E. **An Alphabetical List of Bromeliad Binomials**. 11.ed. Florida: Bromeliad Society International, 114 p. 2008.

LYNCH, P. T. Tissue Culture Techniques in In vitro Plant Conservation. In: BENSON, E.E **Plant conservation biotechnology**, Taylor & Francis. 1999.

MARTINELLI, G. The Bromeliads Of The Atlantic Forest. **Scientific American**, USA, v. 282, n. 3, p. 86-93. 2000.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALES, 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

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; LEITMAN, P.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae. In **Plantas da Floresta Atlântica** (J.R. STEHMANN, R.C. FORZZA, A. SALINO, M. SOBRAL, D.P. COSTA & L.H.Y. KAMINO). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.186-204. 2009.

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 Biociências**, v. 5, p. 972-974. 2007.

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

MOBOT, 2008. Missouri Botanical Garden, W3 Specimen Data Base. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/>. Acesso em: 16 setembro 2011.

MORAN, G. P.; COLQUE, R.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C. Mass Propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 49–60. 2003.

MOREIRA, B. A.; WANDERLEY, M. G. L.; CRUZ-BARROS, M. A. V. **Bromélias: Importância ecológica e diversidade**. Taxonomia e morfologia. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente - Curso de Capacitação de monitores e educadores. São Paulo, 2006.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Bahia, 2008.

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

MYERS, N.; MITTERMAYER, R.A.; MITTERMAYER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.

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

PAIVA, P.D.O.; NAVES, V.C.; DUTRA, L.F.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. *In Vitro* Propagation Of *Nidularium fulgens* Lem. **Interciencia**, v. 34, n. 8. 2009.

PARDO, A.; MICHELANGELI, C.; MOGOLLÓN, N.; ALVARADO, G. Regeneración *in vitro* de *Billbergia rosea* Hortus Ex Beer a partir de ápices caulinares. **Bol. Centro Invest. Biol.**, v. 42, n. 4, p. 491-505. 2008.

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. **Sci. Hort.** v. 24, p.193-199, 1984.

POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Micropropagation enables the mass propagation and

conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 117-126. 2005.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. **Embriogênese somática em *Vriesea reitzii* Leme & Costa**. In.: VIII Congresso Brasileiro De Fisiologia Vegetal, Ilhéus, BA, Anais., p.278, 2001.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, SC. 2004.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L.L.; NODARI, R.O.; LISCHKA, R.W.; MULLER, 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. In: **Fl. II. Catarinense, Fasc. Brom.** 559 p. 1983.

ROCHA, M. A. C. **Multiplicação e Conservação De Bromeliaceae Ornamentais**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). Universidade Federal Do Recôncavo Da Bahia, Cruz das Almas, BA. 2010.

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). **Heringia**, v. 64, n. 2, p. 151-156. 2009.

SILVA, F. de A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas Dos Remanescentes Florestais Da Mata Atlântica Período 2005-2008: Relatório Parcial**. São Paulo. 2009.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; COSTA, C.M.R. The Atlantic Forest of Brazil: endangered species and conservation planning. In: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C. p. 86-94. 2003.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**. v. 1, n. 1, p 132-138. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed. 820p. 2006.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v.1, p.297-330, 1998.