

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL**

WALDESSE STORCH ROSA

**DESEMPENHO DO APARATO FOTOSSINTÉTICO EM FUNÇÃO DAS
CITOCININAS EMPREGADAS DURANTE A FASE DE
MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Aechmea blanchetiana*
(BROMELIACEAE)**

**SÃO MATEUS, ES
2017**

WALDESSE STORCH ROSA

**DESEMPENHO DO APARATO FOTOSSINTÉTICO EM FUNÇÃO DAS
CITOCININAS EMPREGADAS DURANTE A FASE DE
MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Aechmea blanchetiana*
(BROMELIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, na área de concentração Ecofisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto.

Coorientadores: Prof. Dra. Andréia Barcelos Passos Lima Gontijo; Dr. João Paulo Rodrigues Martins.

SÃO MATEUS, ES
2017

WALDESSE STORCH ROSA

**DESEMPENHO DO APARATO FOTOSSINTÉTICO EM FUNÇÃO DAS
CITOCININAS EMPREGADAS DURANTE A FASE DE
MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Aechmea blanchetiana*
(BROMELIACEAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



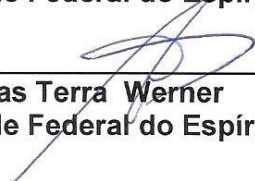
Profª. Drª. Andréia Barcelos Passos Lima Gontijo
Coorientadora
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr. João Paulo Rodrigues Martins
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador



Dr. Luiz Carlos de Almeida Rodrigues
Universidade Federal do Espírito Santo



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

A minha digníssima esposa Suéli e aos meus amados filhos Kárlon e Micaély, por ser a razão de minha vida.

A minha querida e amada mãe Irene por ter me dado o dom da vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo carinho, cuidado e por me permitir viver até a concretização deste momento importante em minha vida. Foram muitas horas de dedicação, dificuldades e incertezas, mas, jamais poderei eu negar a Tua companhia comigo me dando a força necessária para alcançar o meu objetivo.

A Universidade Federal do Espírito Santo por oportunizar de forma democrática, com valorização do mérito, a condição de ensino de qualidade a todos discentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical por proporcionar a possibilidade de me tornar Mestre em uma área voltada para a conservação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de amparo à pesquisa, cuja viabilização, tornou possível a conclusão deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas (DCAB) por ter concedido parecer favorável à realização desta pesquisa.

À secretaria unificada de pós-graduação que através da prestação de seus serviços gerais ou quando solicitada, prestou atendimento direto, com rapidez e que contribuiu para a execução deste trabalho.

Ao meu orientador Antelmo Ralph Falqueto pela sabedoria e sensatez, por ter me concedido a oportunidade de ser seu orientando e ter me direcionado para o rumo certo quando em dificuldades que surgiram no decorrer do trabalho.

Ao meu coorientador João Paulo Rodrigues Martins que pelo seu vasto conhecimento em cultura de tecidos e por ser uma pessoa metódica e organizada, me ensinou muito da técnica *in vitro*. Além disso, contribuiu de forma significativa em meu desenvolvimento da escrita.

À minha coorientadora Andréia Barcelos Passos Lima Gontijo por oportunizar o uso do espaço e dos instrumentos em seu laboratório, além de contribuir com esclarecimentos técnicos quando necessários.

Ao Dr. Luiz Carlos Almeida Rodrigues por ser detentor de um grande conhecimento, ser didático ao me ensinar com paciência a trabalhar com *software* para fazer as medidas anatômicas. Além disso, contribuiu na arte das figuras para o artigo.

Ao André Felipe Costa Souza, colega de turma 2016/1, pela ajuda sempre bem vinda, tanto na coleta dos dados de fluorescência quanto no auxílio na triagem e na elaboração dos gráficos iniciais de fluorescência.

À Elizangela Rodrigues Santos pelo auxílio na inoculação das sementes e nas coletas de dados para as análises de crescimento e de fluorescência.

A todos os colegas de ambos os laboratórios (cultura de tecidos e ecofisiologia vegetal) cujo tempo que convivemos durante o decorrer do mestrado, proporcionou momentos alegres, descontraídos e de trocas de experiências que certamente contribuíram para esta conquista.

Por fim, agradeço a todos os professores com os quais pude conviver e aprender enquanto estive vinculado a instituição.

Os meus sinceros agradecimentos: muito obrigado a todos!

*Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro!
E mais excelente, adquirir a prudência do que a prata!
Rei Salomão (1050 – 931 a.C.).*

RESUMO

A cultura de tecidos pode contribuir para a propagação de diversas espécies vegetais de importância ecológica ou ameaçadas de extinção, tais como as bromélias. Durante a fase de multiplicação *in vitro*, o emprego de citocininas pode ser indispensável para a indução de brotos laterais em diversas espécies. Contudo, análises sobre as desordens fisiológicas induzidas pelos fitorreguladores ainda não é bem entendida, principalmente sobre o aparato fotossintético. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de citocininas em função da concentração, na taxa de multiplicação, no desempenho do aparato fotossintético e na funcionalidade estomática de *Aechmea blanchetiana* durante a fase de multiplicação *in vitro*. Plantas de *A. blanchetiana* previamente estabelecida *in vitro* foram inoculadas em meio MS suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) ou 6-furfurilaminopurina (KIN) nas concentrações: 0, 5, 10, 15 e 20 μM . Após 60 dias de exposição aos fitorreguladores, foi analisada a taxa de multiplicação, o desempenho do aparato fotossintético (fluorômetro portátil Handy PEA) e a caracterização da funcionalidade estomática dos explantes em função dos tratamentos. Não foi observada formação de brotos na ausência de citocininas exógenas (controle). O uso de KIN não induziu formação de brotos e nem incremento de massa fresca, independentemente da concentração utilizada. Foi verificado incremento significativo de massa fresca e de brotos em plantas cultivadas com BAP, à medida que aumentou a concentração. O tipo e a concentração de citocininas também influenciaram o aparato fotossintético das plântulas. A fluorescência transiente da clorofila *a* apresentou forma típica das curvas OJIP com pontos J e I bem definidos. Foi observada a redução na produção quântica (F_v/F_m) em função da concentração, em todos tratamentos com citocininas exógenas, exceto, para o tratamento com 5 μM de BAP. O decréscimo mais acentuado em produção quântica foi verificado nas plantas tratadas com KIN. Na avaliação anatômica, foi encontrada uma redução da funcionalidade estomática, em resposta ao aumento da concentração de citocininas. As citocininas exógenas influenciam a fisiologia do aparato fotossintético e a anatomia de plântulas de *A. blanchetiana* durante a multiplicação *in vitro*. A KIN não é indicada para a multiplicação desta espécie *in vitro*. O emprego de BAP em menores concentrações proporcionou a quebra da dominância apical e a formação de brotos, com menor grau de distúrbios no aparato fotossintético dos brotos formados.

Palavras-chave: Cultura de tecidos vegetais. Fluorescência da clorofila *a*. Fotossistema II. Bromélia. Fisiologia vegetal. Anatomia vegetal.

ABSTRACT

Tissue culture can contribute to the spread of several plant species of ecological or endangered importance, such as bromeliads. During the *in vitro* multiplication phase the use of cytokinins may be indispensable for the induction of lateral shoots in several species. However, analyzes on the physiological disorders induced by the growth regulators are still not well understood, especially on the photosynthetic apparatus. Thus, our objective was to evaluate the influence of cytokinins as a function of concentration, the multiplication rate, the performance of the photosynthetic apparatus and the stomatal functionality of *Aechmea blanchetiana* during the *in vitro* multiplication phase. Plants of *A. blanchetiana* previously established *in vitro* were inoculated in MS medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) or 6-furfurylaminopurine (KIN) at concentrations: 0, 5, 10, 15 or 20 μM . After 60 days of exposure to the growth regulators, the multiplication rate, the performance of the photosynthetic apparatus (Handy PEA fluorometer) and the characterization of the stomatal functionality of the explants as a function of the treatments were verified. No sprout formation was observed in the absence of exogenous cytokinins (control). The use of KIN did not induce shoot formation or increase of fresh mass, regardless of the concentration used. A significant increase of fresh mass and shoots was observed in plants cultivated with BAP, as the concentration increased. The type and concentration of cytokinins also influenced the photosynthetic apparatus of the seedlings at 60 days of culture *in vitro*. The transient fluorescence presented a typical form of OJIP curves with well-defined points J and I. The reduction in quantum yield (F_v / F_m), as a function of concentration, was verified in all treatments with exogenous cytokinins, except for the treatment with 5 μM BAP. The most significant decrease in quantum yield was verified in plants treated with KIN. In the anatomical evaluation, the reduction of the stomatal functionality was verified, in response to the increased concentration of cytokinins. Exogenous cytokinins influence the physiology of the photosynthetic apparatus and the anatomy of *A. blanchetiana* seedlings during *in vitro* multiplication. KIN is not indicated for the multiplication of this species *in vitro*. The use of BAP at lower concentrations ensures a reduction of apical dominance and bud formation, with less degree of disturbance in the photosynthetic apparatus of the shoots.

Keywords: Plant tissue culture. Chlorophyll *a* fluorescence. Photosystem II. Bromeliad. Plant physiology. Plant anatomy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA (FAMÍLIA BROMELIACEAE)	14
2.1. Família Bromeliaceae	14
2.2. Importância ecológica.....	15
2.3. Importância econômica	16
2.4. Conservação de Bromeliaceae	19
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> : contribuição para preservação	21
2.6. Caracterização da técnica e do ambiente <i>in vitro</i>	23
2.7. Características das plantas micropropagadas	27
2.8. Aclimatização <i>ex vitro</i>	28
2.9. Cultivo <i>in vitro</i> da espécie <i>Aechmea blanchetiana</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	32
3.2. Cultivo <i>in vitro</i>	32
3.3. Análise da taxa de multiplicação	33
3.4. Análise da cinética da fluorescência da clorofila <i>a</i>	33
3.5. Caracterização da funcionalidade estomática.....	34
3.6. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Parâmetros fitotécnicos	36
4.2. Análise da cinética da fluorescência da clorofila <i>a</i> e teste-JIP	36
4.3. Análise da funcionalidade estomática	42
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

O Bioma Mata Atlântica é rico em biodiversidade e devido aos níveis de ameaças e de sua pequena área remanescente, ele é classificado ao lado de outras 33 áreas como um dos *hotspots* mundiais (MITTERMEIER et al., 1999; PINTO et al., 2006). O Bioma está subdividido em diversas formações abrangendo a costa Leste brasileira. Dentre estas, as planícies costeiras de solo predominantemente arenoso, formação recente, coberto por vegetação típica de baixo a médio porte, como as comunidades de praias de ante dunas, sendo classificadas como ecossistemas de restinga (ARAÚJO; LACERDA, 1987). Estas formações vêm sofrendo ao longo dos anos constantes agressões antrópicas que incluem as queimadas propositalis e o estabelecimento de cidades dentro de seu domínio (SILVA; GOMES; CRUZ, 2015). Assim, estudos que visem conservação destes ambientes e manejo das espécies são de fundamental importância para a preservação da biodiversidade, principalmente em se tratando de espécies endêmicas de uma região (PINTO et al., 2006).

A soma de conhecimentos adquiridos para uma espécie se torna uma prioridade para as ações de manejo (COELHO; CARDOSO-LEITE; CASTELLO, 2016). A falta de conhecimento técnico científico, com destaque para espécies nativas, tem se constituído como uma barreira para as ações envolvendo conservação (NEGRELLE; MITCHELL; ANACLETO, 2012). Para as espécies vegetais, o cultivo *in vitro* tem contribuído com boa parte das informações necessárias. Estudos partindo da germinação de sementes *in vitro*, com intuito de manter o *pool* genético de uma espécie, e o desenvolvimento de protocolos de micropropagação ideais permitindo a redução das perdas na aclimatização das plantas em *ex vitro*, são impreterivelmente desejáveis em qualquer projeto de conservação (AOYAMA; GONTIJO; FARIA, 2012).

Durante o cultivo *in vitro*, fatores de natureza química ou hormônios vegetais endógenos desempenham papel fundamental no desenvolvimento e na morfogênese dos explantes (JIMÉNEZ, 2005). A zeatina isolada pela primeira vez em sementes de milho (LETHAM, 1963), forma o grupo mais importante das citocininas ativas de ocorrência natural (GAJDOŠOVÁ et al., 2011). Elas estão envolvidas no controle do ciclo celular, na diferenciação de tecidos, no atraso da senescência foliar e na quebra da dominância apical (AREMU et al., 2012; ZHAO et al., 2015; MANGIERI et al., 2017). Concentrações ótimas de

citocininas ativas são essenciais para o controle do crescimento, sendo alcançadas através de biossíntese, regulação e catabolismo (BIANCO; GIUSTINI; SABATINI, 2013).

O uso de citocininas sintéticas é um procedimento amplamente aplicado em cultura de tecidos (CHU et al., 2010). A 6-benzilaminopurina (BAP), a 6-furfuriadenina (KIN) e o tidiazurom (TDZ) são exemplos de citocininas sintéticas empregadas em cultivo *in vitro* (QUIROZ et al., 2017; MARTINS et al., 2014; PING et al., 2010). Dentre estas, BAP é a citocinina sintética de uso mais abrangente. É reportada em trabalhos com praticamente todos os grupos de plantas durante o cultivo *in vitro*, na etapa de propagação (DZIEDZIC; MCDONALD, 2016; ROLLI et al., 2015; KRISHNAN; MURUGAN, 2014) inclusive com bromélias (CORREDOR-PRADO et al., 2015; MARTINS et al., 2014; SOUZA, T. V. et al., 2016).

A aplicação de citocinina exógena na cultura de tecidos vegetais tem um importante papel regulador em vários processos fisiológicos e morfogênicos (AREMU et al., 2012). A sua influência pode ser verificada na preservação da clorofila *a* através da redução da atividade da clorofilase (ZAVALETA-MANCERA et al., 2007). Elas estimulam a produção e acúmulo de carotenoides como consequência de elevação do estresse (GENTILE et al., 2016). Podem atrasar a senescência ativando genes que mantém a relação clorofila *a/b* nas folhas (TALLA et al., 2016). Além disso, citocininas podem quebrar a dominância apical elevando a produção de biomassa ao estimular a formação de brotação lateral (MARTINS et al., 2014).

Durante o cultivo *in vitro*, o uso de citocininas exógenas pode induzir distúrbios fisiológicos e anatômicos em folhas (MARTINS et al., 2015a; TAKEUI et al., 2017). Foi verificado incremento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BENSON, 2000), que pode reduzir a atividade de ambos os fotossistemas (SONOIKE, 2011). A elevação de suprimentos exógenos de citocininas ativa genes que elevam o conteúdo endógeno de enzimas citocininas oxidase/desidrogenase (NISLER et al., 2016) e isso pode levar ao desequilíbrio hormonal endógeno que afeta o estado de desenvolvimento e a função do aparelho fotossintético de brotos *in vitro* (DOBRÁNSZKI; MENDLER-DRIENYOVSKY, 2014). Concentrações de citocininas (supra ideais) provocaram alterações na forma típica e no mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos. Além de variações na espessura da epiderme foliar, como verificado em explantes de bromélias durante o cultivo *in vitro* (MARTINS et al., 2015a).

A avaliação dos distúrbios anatômicos por meio de cortes histológicos de órgãos vegetais vem sendo usada como uma importante ferramenta de análise de plantas micropropagadas. Haja vista o bom número de trabalhos produzidos atualmente que fazem o uso da técnica

(MARTINS et al., 2014; ANTONIAZZI et al., 2016; EBURNEO et al., 2017). Outra ferramenta de grande importância nas avaliações de estresse, com foco na fisiologia da fotossíntese primária (fotoquímica), é a análise de fluorescência transiente da clorofila *a*. Por meio desta técnica não destrutiva, o estado fisiológico imediato do aparato fotossintético pode ser verificado (BAKER, 2008). Através dos parâmetros do teste JIP desenvolvido por Strasser e Strasser (1995), o comportamento do fluxo linear de elétrons através do fotossistema II, citocromo *b6f* e fotossistema I pode identificar o ponto do dano ou do mau funcionamento do aparato fotossintético (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004; OUKARROUM; SCHANSKER; STRASSER, 2009).

O emprego de citocininas durante a fase de multiplicação *in vitro* pode ser determinante para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação de muitas espécies vegetais. A maioria dos estudos relacionados à micropropagação leva em consideração apenas o número de brotos sem verificar a qualidade fisiológica dos novos brotos formados. Dessa forma, ainda não está claro como as citocininas atuam sobre o aparato fotossintético das plantas durante o cultivo *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar as alterações no aparato fotossintético e na funcionalidade estomática de plantas de *A. blanchetiana* expostas a duas citocininas, bem como a sua efetividade na indução de brotos laterais durante o cultivo *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA (FAMÍLIA BROMELIACEAE)

2.1 Família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae é composta por, aproximadamente, 3.352 espécies agrupadas em 58 gêneros (LUTHER, apud HELLER et al., 2015). Sendo distribuída em oito subfamílias: Broncchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Bromelioideae (STEVENS, acesso em 05 de fevereiro de 2017).

As bromélias são plantas encontradas quase que exclusivamente no continente americano, mais especificamente da região neotropical. Região biogeográfica que compreende o sul da América do Norte, incluindo a América Central e ilhas do Caribe e em praticamente toda a América do sul até na região da Patagônia na Argentina. Elas encontram-se distribuídas em dois principais centros de biodiversidade: a costa leste do Brasil e o escudo das guianas. De todas as espécies de bromélias, apenas a *Pitcairnia feliciana* (A. Chevalier) Harms e Mildbraed encontra-se fora do continente americano, distribuída na zona equatorial oeste do continente africano (SMITH; DOWNS, 1974).

A maior parte dos Gêneros de Bromeliaceae (mais de 70%) e quase a metade de todas as espécies descritas, são encontradas no Brasil (PAULA, 1998). A mata atlântica do sudeste é o bioma mais rico em espécies de bromélias, entretanto, a distribuição das espécies pelo bioma não é homogênea, as densidades populacionais e biodiversidade são maiores em altitudes acima de 1400 m (MONTEIRO; FORZZA, 2008). Sendo o norte do Espírito Santo e a região sul do Estado da Bahia, locais de elevado número de espécies endêmicas (FONTOURA; SANTOS, 2010).

Os gêneros *Andrea*, *Canistropsis*, *Canistrum*, *Edmundoa*, *Fernseea*, *Lymanea*, *Nidularium*, *Portea*, *Quesnelia* e *Wittrockia* são exclusivos do bioma Mata Atlântica e os gêneros *Vriesea* (166 spp.), *Aechmea* (133 spp.) e *Neoregelia* (97 spp.) são os que apresentam maior biodiversidade. Os gêneros *Alcantarea*, *Cryptantus*, *Orthophytum* e *Neoregelia* não são endêmicos do bioma, porém, é neste bioma que possuem suas maiores representações de espécies (MARTINELLI et al., 2008).

2.2 Importância ecológica

As bromélias são plantas de grande importância biológica, pois fornecem indispensáveis recursos para a vida selvagem (SCHUTTZ et al., 2012). Muitos animais fazem uso de seus frutos e de néctar de suas flores como parte de suas dietas (CATENACCI et al., 2016), outros usam as partes moles da planta (herbivoria e predação) como fonte de carboidratos (OLIVEIRA, 2004). A capacidade de armazenar água no tanque formado pelo imbricamento das folhas permite a esta família de plantas, propiciar local adequado para aumentar a biodiversidade de espécies associadas a ela, favorecendo a comunidade biológica como um todo. Além disso, em locais com baixa quantidade de água livre como as restingas, a água acumulada nos tanques contribui com a manutenção no sistema de pelo menos 1.300 L de água livre por hectare. Em muitos casos, esta é a única fonte de água livre disponibilizada para a manutenção de outros organismos (ROCHA et al., 2004).

É oportuno ressaltar também, que as bromélias disponibilizam nos ecossistemas, locais propícios para a germinação de sementes dentro do tanque central ou nos tanques secundários da roseta foliar. Essa capacidade faz dessas plantas, berçários para a germinação de sementes. Para a família Clusiaceae, as bromélias tanque desempenham importante papel na germinação e no estabelecimento das mudas no ecossistema de restinga. Algumas mudas germinadas em tanques podem permanecer ali por mais de 200 dias até que sua raiz toque o solo. Dessa forma, as bromélias fornecem todo o aporte de minerais e de água necessários para o crescimento inicial das plântulas no ambiente (CORREIA; LIMA; SILVA, 2013).

Outro fator relevante para a família Bromeliaceae é a sua capacidade de ciclagem de nutrientes em florestas. Bromélias e outras epífitas são importantes coletores de nutrientes alóctones vindos da atmosfera junto com a chuva (LANG; REINERS; HEIER, 1976) ou também vindos através das fezes de diversos animais, que eventualmente são depositadas em seus tanques (BENZING, 2000; WALDEMAR; IRGANG, 2003). Essas plantas ao incorporarem em sua biomassa esses minerais, tornam-se importantes fornecedoras desses recursos em florestas tropicais úmidas. Além do mais, estas plantas podem manter uma fonte com distribuição contínua de nutrientes na superfície do solo, repondo o que foi percolado pela lixiviação para as camadas mais profundas (LEPSCH, 2016).

Estudos realizados por Oliveira (2004) em mata atlântica do Rio de Janeiro confirmaram que de toda serapilheira produzida em um trecho de floresta atlântica durante o período de um

ano, apenas 3,1% da serapilheira total foi de bromélias epífitas. Porém, mesmo sendo uma fração pequena quando comparada a serapilheira total, a fração produzida pelas bromélias epífitas apresentou decomposição mais rápida em relação à serapilheira produzida por outras espécies vegetais. Por isso, a serapilheira de bromélias epífitas devolve mais rápido ao ambiente os minerais aprisionados na matéria orgânica, permitindo assim, a absorção dos minerais livres, por outras espécies vegetais.

2.3 Importância econômica

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR, acesso em 26 de agosto de 2016), o ramo da floricultura vem crescendo nos últimos anos. Em 2012 o setor apresentou um faturamento de R\$ 4,8 bilhões, em 2013 R\$ 5,2 bilhões e em 2014 R\$ 5,7 bilhões de reais, equivalendo a 0,6% do PIB agrícola do Brasil. Desse total, o Estado de São Paulo detém o maior faturamento do setor (R\$ 1.975.550.000,00 em 2014) e possui também o maior consumo per capita de plantas e flores (R\$ 44,86), sendo seguido de perto pelo Distrito Federal (R\$ 43,85), Rio Grande do Sul (R\$ 38,39) e Rio de Janeiro (R\$ 37,79). O consumo médio per capita de plantas ornamentais no Espírito Santo é de R\$ 21,00 e a média no Brasil é de R\$ 26,68. Os números impressionam, porém, quando comparamos o Estado de São Paulo (R\$ 44,86) que possui o maior consumo per capita de plantas do Brasil com o principal consumidor europeu, a Alemanha, que detém valor médio per capita de R\$ 195,00, percebemos ainda o quanto podemos crescer nesse segmento.

As bromélias no ramo de plantas ornamentais são classificadas como plantas destinadas ao paisagismo, sendo que algumas espécies também são classificadas como plantas de vaso (IBRAFLOR, acesso em 26 de agosto de 2016). As plantas destinadas ao paisagismo movimentaram no Brasil em 2014 cerca de R\$ 649.395.492,00. Desse valor total comercializado, não é possível definir qual a porcentagem é representada exclusivamente pelo comércio de bromélias, uma vez que um número considerável de produtores trabalha também com outros grupos de plantas além de bromélias (NEGRELLE; ANACLETO; MITCHELL, 2012).

O uso das bromélias como plantas ornamentais se deve ao intrincado formato de suas folhas proporcionando belas formas, apresentam cores e detalhes variados, necessitando de baixa demanda de manutenção no cultivo e ser de fácil adaptabilidade a pequenos jardins

(NEGRELLE; ANACLETO; MITCHELL, 2012). Dentre todos os gêneros comercializados para fins ornamentais alguns merecem destaque: *Aechmea*, *Alcantarea*, *Cryptanthus*, *Guzmania*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Tillandsia* e *Vriesea*. O que realmente define a aceitação de uma muda no mercado consumidor é a uniformidade de tamanho e o arquétipo da planta, cujo sucesso depende da estrutura do local de produção, das tecnologias de cultivo adotadas e do cuidado necessário ao transportar as plantas até o destino (ANACLETO; NEGRELLE, 2013).

O uso das bromélias pelo homem para alimentação, como fonte de fibras e medicamentos, data de séculos antes do descobrimento da América. Porém, foi a partir do descobrimento que o fruto da espécie *Ananas comosus* L. Merrill passou a ser disseminado para outras partes do mundo (BENZING, 2000). Além do fruto do abacaxizeiro (*A. comosus*) apenas outras poucas espécies de Bromeliaceae (*Ananas ananassoides* (Baker) L.B. Smith; *Bromelia karatas* L.; *Bromelia balansae* Mez. e *Bromelia antiacantha* Bertol) são citadas como plantas produtoras de frutos utilizados como alimento pelo homem (CERON et al., 2016; PEREIRA; SANTOS, 2016).

Atualmente o abacaxi é um dos frutos mais consumidos em praticamente todos os continentes, principalmente na forma de suco, sendo por isso, um grande gerador de riqueza (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014). A produção mundial de abacaxi em 2013 foi de 24.785.762 toneladas com destaque para a Ásia com 44,7% e a América com 37,2% do total, concentrando apenas nos dois continentes mais de 80% da produção. O Brasil é o segundo maior produtor mundial (10%) ficando atrás apenas da Costa Rica (10,8%) do total produzido (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION, Acesso em 04 de setembro de 2016). A produção de abacaxi no Brasil fica concentrada na região Nordeste (35,21%), Sudeste (29,41%) e Norte (28,25%) abrangendo mais de 90% da produção brasileira (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014).

O uso das bromélias na medicina popular é conhecido desde a época do descobrimento das Américas e após o descobrimento houve a disseminação do uso destas plantas no tratamento de doenças. Estas foram levadas para outros continentes de forma semelhante ao que ocorreu com o fruto do abacaxizeiro (BENZING, 2000). O potencial medicinal e farmacológico destas plantas está relacionado à presença de metabólitos secundários do tipo terpenoides e flavonoides em sua composição química (CERON et al., 2016).

As espécies mais estudadas quimicamente como plantas de potencial farmacológico são *Ananas comusus* e *Tillandsia usneoides*. Estas plantas apresentam reconhecidas propriedades medicinais agindo como estomáquico, carminativo, diurético, anti-inflamatório, problemas das vias respiratórias, neurastenia, anti-diabético, anti-hiperlipidimêmico, antioxidante, anti-inflamatória, depurativo, anti-hemorroide, antiespasmódico, anti-hipertensiva e antibiótica. Outras espécies também foram estudadas como *Nidularium procerum* encontrada na Mata Atlântica, revelando importante potencial terapêutico, com destaque para a atividade antialérgica e anti-eusínofila incluindo uma potente atividade analgésica (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE, 2009).

A família Bromeliaceae é economicamente importante por produzir entre outros compostos a enzima bromelina, uma substância largamente empregada na indústria alimentícia e farmacêutica (MACIEL et al., 2016; PEIXOTO et al., 2016). A bromelina apesar de ser encontrada em quantidades expressivas em todas Bromeliaceae, a sua extração comercial fica resumida na espécie *Ananas comusus*. Pois a planta, após a colheita do fruto, pode ser descartada ou utilizada para outros fins. Com novas descobertas de usos da bromelina, há diversos pedidos de patentes, no Brasil e no mundo, abrangendo áreas da indústria, da medicina e da farmacologia (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE, 2009). Embora seja grande a biodiversidade de bromélias no Brasil, poucas espécies ainda são estudadas quimicamente e farmacologicamente. No entanto, é promissor o estudo químico dessa família, pois podem revelar princípios ativo importantes do ponto de vista científico farmacológico (ASSIS; MORELLI-AMARAL; PIMENTA, 2015).

A produção e o comércio de fibras naturais advindas de bromélias são outra fonte de recurso que o homem vem utilizando de longa data (BENZING, 2000). Nesse segmento, pelo menos duas espécies de Bromeliaceae se destacam: o caroá (*Neoglaziovia variegata*) e o abacaxi (*Ananas comusus*). A primeira espécie não é cultivada comercialmente. Suas folhas são coletadas diretamente das plantas da caatinga, das quais se extraem as fibras que são importante matéria-prima para a construção de cordas, chapéus, redes, redes de pesca, bolsas e tecidos (SILVEIRA et al., 2009). A segunda, por ser a bromélia mais cultivada, gera muitas plantas descartadas após a colheita dos frutos e que podem ser utilizadas para a extração de fibras (MISHRA et al., 2004).

As fibras naturais possuem características físicas e químicas vantajosas como resistência e leveza quando comparadas a outros materiais usados na indústria. Por isso, o uso de fibras vem se intensificando em substituição a outras matérias primas como metais, cerâmicas e

fibras sintéticas. Sendo assim, as fibras naturais possuem importantes aplicações na indústria automobilística, aeroespacial, marinha, esporte e lazer e eletrônica (THAKUR; THAKUR, 2014). A Alemanha é o país que mais se utiliza das fibras naturais em sua indústria, principalmente, a indústria automobilística, que recebe incentivos do governo para que aumente a porcentagem dessas fibras nos componentes de seus veículos (PUGLIA; BIAGIOTTI; KENNY, 2005). Em pleno século 21 alternativas como estas devem ser incentivadas, pois estimulará mais pesquisas para desenvolvimento de novos produtos de origem sustentável (SANJAY et al., 2016).

2.4 Conservação de Bromeliaceae

A Mata Atlântica, um dos ecossistemas mais ricos do planeta, é considerada um dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade. O bioma está entre as oito áreas prioritárias para conservação mundial (MYERS et al., 2000; ROSUMEK et al., 2008). Porém, é um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo, restando aproximadamente 7,26% de sua extensão original (MORELLATO; HADDAD, 2000; PILATTI et al., 2011). Nesse ecossistema, a família Bromeliaceae excede qualquer outra família de plantas no fornecimento de recursos à biota local (BENZING, 2000) e múltiplos recursos para o homem (CERON et al., 2016; MANETTI et al., 2009; NEGRELLE; ANACLETO; MITCHELL, 2012). Por isso, é uma das mais importantes, apresentando elevada riqueza, diversidade e endemismo, além de ser a que possui o mais alto número de espécies ameaçadas, colocando a família como prioridade em programas de conservação da biodiversidade (PILATTI et al., 2011).

Dentre 953 táxons específicos e infra específicos de Bromeliaceae registrados na Mata Atlântica, 338 encontram-se citados em alguma das listas de espécies ameaçadas, com 54 espécies incluídas na categoria “criticamente em perigo” (CR), 89 “em perigo” (EP), 182 “vulneráveis” (VU) e 17 “raras” (R) (MARTINELLI et al., 2008). Dessa maneira, dentre as espécies registradas na Mata Atlântica, cerca de 40% encontram-se sob alguma categoria de ameaça. Dentre as 107 espécies de plantas listadas como extintas ou criticamente em perigo no Brasil, 15 são bromélias (INSTRUÇÃO NORMATIVA, 2008) e, nesse grupo, três espécies foram consideradas extintas da natureza (MARTINELLI; MORAES, 2013). É provável que estes números estejam subestimados devido ao pouco conhecimento do real estado de conservação das populações em ambientes naturais. O reduzido número de

espécimes depositados nos herbários compromete a avaliação da distribuição geográfica dos táxons (MARTINELLI et al., 2008).

O desaparecimento de espécies ocasionado por fatores naturais é muito comum no decorrer da história da terra. Fenômenos como aquecimento e resfriamento da atmosfera ocasionado pela alteração das taxas dos gases do efeito estufa, diminuição e progressão das calotas polares, elevação e recuo dos oceanos, chuvas e secas intensas, deslizamentos e soterramentos, vulcanismo com espalhamento de cinzas e lava, alterações bruscas de pH dos solos e das águas são fatores que ocorreram e ocorrem com natural frequência, dizimando populações ou causando o desaparecimento de espécies (TORRES; SILVA; FERREIRA, 2008). Entretanto, as causas antrópicas ainda é o principal problema a ser solucionado para que um número maior de espécies não desapareça (GRAIPEL et al., 2016).

Para a família Bromeliaceae, as principais causas antrópicas responsáveis pela redução de suas populações da natureza e a consequente submissão das espécies a algum tipo de ameaça, a fragmentação de seu hábitat e o extrativismo exploratório são apontados como os fatores de maior relevância (ANACLETO; NEGRELLE, 2013; MEDEIROS; SANGALLI, 2015; SOUZA, W.O. et al., 2016).

A importância da conservação das espécies é um assunto muito discutido atualmente. A manutenção de espécies em seu local de origem (*in situ*) é uma das formas mais eficientes de conservação (GODOY, 2015), principalmente, para as espécies endêmicas ou as ameaçadas (COLLI-SILVA, 2016). A primeira área destinada como unidade de conservação (UC) *in situ* foi o Parque Nacional de Yellowstone nos Estados Unidos, criado em 1872 (BRITO, 2000). A partir desta primeira UC muitas outras foram criadas em todo o mundo e no Brasil elas chegam a abranger 17% do território nacional (COSTA-PEREIRA et al., 2013). Embora esta proporção seja aparentemente insuficiente para conservar a grande biodiversidade existente em seu território, o Brasil ainda é considerado um dos países com maior quantidade de unidades de conservação do mundo (WATSON et al., 2014).

Além da manutenção de espécies em unidades de conservação, outras formas para manter a biodiversidade vêm sendo utilizadas. A manutenção de coleções vivas (arboretos) em jardins botânicos (*ex situ*) é uma alternativa viável e útil, pois fornece suporte a pesquisa e a inovação tecnológica (FORZZA et al., 2016). A conservação *ex situ* é também realizada por meio de bancos de sementes nativas (SALLA; JOSÉ; FARIA, 2016), bancos de DNA da flora

brasileira criopreservados (SANTOS et al., 2013) e através das técnicas de cultura de tecidos *in vitro* (FONSECA et al., 2015).

2.5 Cultivo *in vitro*: contribuição para preservação

Especialmente com relação à família Bromeliaceae, a instalação e a conservação *in vitro* de bancos de germoplasma se revestem de especial importância. Tendo em vista que diversas espécies encontram-se ameaçadas de extinção em decorrência de práticas extrativistas e de outras ações do homem sobre seus habitats. O que torna mais agravante para as espécies endêmicas, que podem ser irreversivelmente perdidas em decorrência da destruição dos seus ecossistemas (ANACLETO; NEGRELLE, 2013). Portanto, as que envolvem cultura de tecidos são ferramentas valiosas para a propagação em massa de bromélias, subsidiando a produção comercial de espécies ornamentais e fornecendo plantas micropropagadas para reintrodução. Sendo de fundamental importância para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (VESCO et al., 2011; HUANG et al., 2011). Somado a isso, o desenvolvimento de estratégias de exploração sustentável poderia contribuir para o desenvolvimento econômico das comunidades que têm como fins lucrativos o cultivo e a comercialização de bromélias (NEGRELLE; ANACLETO, 2013).

A utilização da biotecnologia para a produção de plantas *in vitro* é conhecida por cultura de tecidos ou micropropagação. Apesar de muitas vezes esses termos serem usados como sinônimos, a micropropagação é a aplicação prática da cultura de tecidos, tratando-se de um tipo de propagação vegetativa realizada *in vitro* usando explantes pequenos (CID, 2010; ARNAO; ENGELMAN, 2013.). A técnica vem sendo utilizada desde a década de 50, período que diversos trabalhos de cultivo *in vitro* envolvendo plantas superiores foram publicados (ALCALDE, 1953, 1955; KIM, 1956; SKOOG; MILLER, 1957; GAUTHERET; LONCHAMP, 1959).

Os primeiros trabalhos envolvendo o cultivo *in vitro* de Bromeliaceae foram desenvolvidos na década de 1970 (MAPES, 1973; ZIMMER; PIEPER, 1976; MEKERS, 1977). Nas últimas décadas, diversos trabalhos foram publicados na literatura, muitos deles envolvem espécies ameaçadas de extinção (MERCIER; KERBAUY, 1992; 1993; 1994; 1995; 1997; CARNEIRO et al., 1998; 1999; ARRABAL et al., 2002; CARNEIRO; MANSUR, 2004; DROSTE et al., 2005; POMPELLI et al., 2005; RECH FILHO et al; 2005; RECH

FILHO; VESCO; GUERRA, 2009; PICKENS et al., 2006; SILVEIRA et al., 2009; CHU et al., 2010; MOLLO et al., 2011; AOYAMA et al., 2012; SALOMÃO, 2014). Em contraste, é interessante notar que, para bromélias, o uso do cultivo *in vitro* visando à realização de pesquisas fisiológicas básicas era raro (NIEVOLA et al., 2005). Contudo, nos últimos anos, vem aumentando a quantidade de trabalhos publicados envolvendo anatomia e fisiologia de Bromeliaceae (MARTINS et al., 2013, 2014, 2015a, 2015b, 2016a, 2016b; RESENDE et al., 2016).

O cultivo *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre as técnicas de propagação convencional, como a rápida multiplicação em um ambiente controlado, redução de espaço físico utilizado para o cultivo, condições livres de patógenos, entre outros (FAY, 1994; ENGELMANN, 1996; KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997). Com o uso da técnica é possível intensificar a produção de mudas de várias espécies inclusive ornamentais (MERCIER; KERBAUY, 1997), atendendo a demanda do mercado de flores e assim, contribuindo indiretamente para a redução do extrativismo predatório como ocorre com bromélias (AOYAMA; GONTIJO; FARIA et al., 2012; ANACLETO; NEGRELLE, 2013).

A propagação das bromélias na natureza é lenta e a produção de mudas através de sementes não supre as necessidades de propagação exigidas, pois as taxas de germinação no ambiente natural, geralmente, são baixas (MERCIER; KERBAUY, 1995) e seu cultivo para comercialização não suporta a demanda necessária que atenda ao mercado consumidor (NEGRELLE; ANACLETO; MITCHELL, 2012). Assim, o desenvolvimento da técnica de cultivo *in vitro* para bromélias ornamentais é uma importante estratégia de conservação, pois possibilita um maior fornecimento de mudas para o mercado consumidor reduzindo a procura por plantas vindas da natureza (TAMAKI et al., 2011; AOYAMA; GONTIJO; FARIA et al., 2012; NEGRELLE; ANACLETO; MITCHELL, 2012).

O estabelecimento do cultivo *in vitro* com intuito de propiciar a diversidade genética das plantas produzidas, normalmente é iniciado através da germinação de sementes (FAY, 1994; MERCIER; NIEVOLA, 2003). Dessa forma, espera-se que a integridade genética das plantas seja mantida evitando assim, o risco de induzir à variação somaclonal, relacionada com a utilização de sistema de cultura de tecidos por meio de calos (MERCIER; NIEVOLA, 2003; CARVALHO; VIEGAS, 2004; SANTIAGO; REINIGER; HANAUER, 2015).

Entre as principais vantagens do cultivo *in vitro* a partir de sementes estão às altas taxas de germinação e a rapidez em que tal evento acontece, quando são comparados ao processo

transcorrido em ambiente natural. Possibilitando a produção de um grande número de plantas matrizes evitando a retirada de organismos da natureza (MERCIER; KERBAUY, 1995). Assim, as plantas obtidas em germinação *in vitro* podem funcionar como plantas doadoras de explantes para o posterior processo de propagação, visando à obtenção de clones, obtendo um número elevado de mudas, auxiliando na redução da atividade extrativista ao ofertar plantas que abastece o mercado paisagístico e o de flores (AOYAMA; GONTIJO; FARIA, 2012; ARRIGONI-BLANK, 2014).

2.6 Caracterização da técnica e do ambiente *in vitro*

Durante o cultivo *in vitro*, fatores como temperatura, luminosidade, água, substratos e nutrientes podem ser controlados (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; KOZAI, 2012). Além disso, o ambiente de cultivo *in vitro* tradicional heterotrófico pode ser caracterizado por apresentar espaço limitado, baixo fluxo de fótons, alta umidade relativa no interior dos frascos, acúmulo de etileno e de substâncias tóxicas, concentrações variáveis de CO₂ entre as horas de fotoperíodo e horas sem luz, alta concentração de açúcar, sais e substâncias reguladoras do crescimento adicionadas ao meio e ausência de microorganismos (JEONG; FUJIWARA; KOZAI, 1995; KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; POSPÓŠILOVÁ et al., 1999; AITKEN-CHRISTIE; KOZAI; SMITH, 2013). Tais fatores físicos, químicos e biológicos encontrados no ambiente *in vitro* convencional são diferentes dos fatores encontrados em casas de vegetação (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997).

Diversas são as fontes de carboidratos que podem ser utilizados pelas plantas durante o cultivo *in vitro*. Alguns principais açúcares são os monossacarídeos hexoses (glicose, frutose, galactose e manose), pentoses (arabinose, ribose e xilose), dissacarídeos (sacarose, maltose, lactose, celobiose, trealose), trissacarídeo (rafinose) e açúcares álcoois (sorbitol, manitol e glicerol). Entretanto, o principal açúcar utilizado em cultivo *in vitro* é a sacarose. Cada carboidrato apresenta função distinta, influenciando distintos efeitos em cada espécie de planta. A sacarose no meio induz a formação e desenvolvimento de brotos, indução de raiz, calogênese e regeneração (YASEEN et al., 2013).

Além do cultivo *in vitro* convencional heterotrófico, quando as plântulas são mantidas em um ambiente fechado sem troca de gases e com alta concentração de sacarose no meio, outras formas de cultivo *in vitro* com permissão de trocas gasosas e baixa adição de sacarose ou até

mesmo sem sacarose, são comumente utilizadas. Esses sistemas são considerados fotomixotrófico quando pequena quantidade de sacarose é adicionada ao meio e parte do recurso de carbono necessário advém do CO₂ da troca gasosa com o ambiente externo. Já no sistema fotoautotrófico, o meio é livre de sacarose e todo recurso de carbono necessário às plântulas é obtido a partir do CO₂ da troca gasosa com atmosfera externa (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; AITKEN-CHRISTIE; KOZAI; SMITH, 2013).

O meio de cultura mais empregado para o cultivo *in vitro* de Bromeliaceae citado pela maioria dos autores é o meio de Murashige e Skoog (1962) – MS em sua formulação básica ou diluída (MERCIER; KERBAUY, 1997; MARTINS et al., 2015a; 2016a). O meio de Knudson (1946) – K também é citado em trabalhos com Bromeliaceae (MAPES, 1973; TAMAKI; MERCIER, 2001; ZAMBERLAN; RICHTER; BODANESE-ZANETTINI, 2004; KURITA et al., 2013;). Contudo, é comum a utilização deste meio em trabalhos com micropropagação em Orchidaceae (ABRÃO et al., 2014; VOGES et al., 2014). Estudos tem demonstrado que para algumas espécies de Bromeliaceae o meio MS diluído (MS/2) incrementa melhores respostas anatômicas e fisiológicas nas plântulas micropropagadas (AOYAMA et al., 2012; KURITA et al., 2013).

A composição e a concentração de fitorreguladores no meio de cultura são fatores determinantes para o crescimento e para o padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos (GALVANESE et al., 2007; CHU et al., 2010). Os principais reguladores de crescimento utilizados nos cultivos *in vitro* de bromélias são o ácido naftaleno acético (ANA) e a 6-benzilaminopurina (BAP), isoladamente ou combinados (MERCIER; KERBAUY, 1997; AOYAMA et al., 2012; MARTINS et al., 2013; 2015a; 2016a), além do ácido giberélico (GA3) (RESENDE et al., 2016). Outras substâncias, como o ácido indolacético (AIA) (VIEHMANNOVA et al., 2016), o ácido indolbutírico (AIB) (LAI; SUN, 2013), o ácido 2,4 diclorofenóxiacético (2,4D) (BADR-ELDEN, 2016), paclobutrazol (PBZ) (POMPELLI; FERNANDES; GUERRA, 2005; SANTOS, 2014), o tidiazurom (TDZ) (PING et al., 2010; GUERRA; VESCO, 2010) e a cinetina (KIN) (MARTINS et al., 2014) são utilizadas em menor escala.

Um dos primeiros passos no estabelecimento de um cultivo *in vitro* é escolher o tipo de explante que será utilizado. Em teoria, qualquer parte de uma planta pode ser usada para iniciar a cultura de tecidos (ZORNIG, 1996). Contudo, em trabalhos que visem conservação, o explante inicial escolhido na maioria das vezes é a semente, pois mantém a integridade genética da espécie (AOYAMA; GONTIJO; FARIA, 2012). Além de sementes, outros

explantos também são utilizados para iniciar a propagação *in vitro* em Bromeliaceae tais como: ápices caulinares (MOGOLLÓN et al., 2004; PARDO et al., 2008), gemas axilares (DIAS et al., 2011; SANTOS et al., 2015), seguimentos nodais (CARVALHO et al., 2009), meristemas (TOMBOLATO et al., 1991) e folhas (MERCIER; KERBAUY, 1992; VINTERHALTER; VINTERHALTER, 1994; SIMÃO et al., 2016).

O meio para o cultivo *in vitro* é comumente suplementado com ágar que é o agente gelificante que torna o meio sólido dando suporte às plântulas estabelecidas em cultura de tecidos. Por outro lado, em cultura de tecidos, outros materiais fibrosos podem ser utilizados como espumas de polietileno, Gelrite, fibras de rochas, fibras cerâmicas, vermiculita ou ainda, chumaços de celulose (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997). A escolha do agente solidificante para suporte das plântulas depende em parte da espécie cultivada. Estudos tem demonstrado que plântulas de *Eucalyptus sp.* cultivadas em meio suplementado com vermiculita, cresceram melhor quando comparadas com plântulas em meios com ágar, Gelrite ou meio líquido estacionário (KIRDMANEE; KITAYA; KOZAI, 1995). Em estudos com plantas da família Bromeliaceae, o meio líquido estacionário ofereceu melhores resultados na fase de propagação (MENGARDA et al., 2009; MARTINS et al., 2015a).

A temperatura das salas de crescimento geralmente passa por pouca variação ao longo do dia. A temperatura que incide sobre a cultura no interior do frasco pode ser de aproximadamente, 1°C superior à temperatura da atmosfera da sala de crescimento, durante o fotoperíodo em sistema de cultivo convencional heterotrófico (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997). Contudo, a elevação da temperatura do ambiente de cultivo pode incrementar a velocidade de crescimento das plantas *in vitro*, uma vez que a temperatura é um fator importante, pois influencia todas as atividades fisiológicas de todos os organismos (BROWSE; XIN, 2001). Para Bromeliaceae de Mata Atlântica, em que a temperatura ambiente pode oscilar de 4° a 40°C em um único dia, a plasticidade de aclimação deve ser grande. Em estudo do efeito da temperatura no crescimento de plantas de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*, foi verificado que a elevação da temperatura da sala de crescimento para 30°C, aumentou a média da velocidade do crescimento em quatro vezes quando comparadas a médias de crescimento das plantas em temperatura de 15°C sob as mesmas condições de cultivo. Entretanto, o padrão morfológico da parte aérea e da raiz e a taxa de sobrevivência das plantas não foram alterados (MOLLO et al., 2011).

Plantas CAM geralmente possuem limitações em sua capacidade reprodutiva, e os indivíduos da família Bromeliaceae apresentam, sob condições naturais, taxas de crescimento lentas

(MERCIER; KERBAUY, 1995). Estudando a bromélia *Ananas comosus* que naturalmente apresenta fotossíntese CAM, Nievola e outros (2005), verificaram que quando plantas são cultivadas *in vitro* e mantidas em temperatura constante de 28°C durante o período de claro/escuro, ocorrem pouca variação hormonal endógena que mantém as plantas utilizando a via de carbono C₃. Isto pode ser verificado ao comparar o tratamento com outro que a temperatura variou de 28°C durante o fotoperíodo para 15°C no período escuro, e que as plantas apresentaram maior oscilação hormonal e mantiveram a forma CAM para obtenção de CO₂.

Em sistemas de cultivo *in vitro* convencional heterotrófico, a densidade do fluxo de fótons (DFF) por metro quadrado por segundo ($\mu\text{mol} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) em geral é baixa em relação (DFF) emitidos pela luz natural (JEONG; FUJIWARA; KOZAI, 1995). Por ser baixa a intensidade luminosa, esse fator influencia reduzindo a taxa de crescimento das plantas *in vitro* (KOZAI, 2012). Além do aumento da intensidade luminosa dentro da sala de crescimento, outras ações como o posicionamento da fonte luminosa na lateral dos frascos ao invés de sobre os frascos e o arranjo planejado dos frascos de cultivo nas prateleiras, são ações que impactam positivamente o crescimento das plântulas em cultura de tecidos (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997).

Outro fator também importante é a água do interior dos frascos que pode ser encontrada sob a forma líquida, no meio de cultivo e nas plantas, e sob a forma de vapor na atmosfera interna do frasco. A alternância do estado físico da água e a sua passagem por cada componente do sistema dá-se o nome de ciclo da água (ODUM, 2006). A relação entre a temperatura e pressão de vapor de água no interior do frasco é o que chamamos de umidade relativa *in vitro*, e que normalmente é alta em cultura de tecidos. Com o uso de frascos que permite trocas gasosas, o controle deste fator comum, durante o cultivo de plantas *in vitro*, torna-se possível (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; VASIL, 2012).

2.7 Características das plantas micropropagadas

O ambiente de cultivo *in vitro* é muito diferente do ambiente ao qual a planta vive sob a condição natural. A condição convencional heterotrófica é a que mais difere da situação natural e frequentemente ocasiona desordens anatômicas e fisiológicas nas plantas micropropagadas (DEBERGH; MAENE, 1984). Sob estas condições, as plantas frequentemente apresentam baixas taxas respiratórias, baixas taxas de fotossíntese, baixa absorção de água, nutrientes e de CO₂, porém, uma alta taxa de respiração no período escuro. Todas estas alterações ocorrendo simultaneamente resultam em baixo crescimento e baixo desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (JEONG; FUJIWARA; KOZAI, 1995; KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; AITKEN-CHRISTIE; KOZAI; SMITH, 2013).

Amiúdes desordens anatômicas e fisiológicas que sofrem as plantas em cultivo *in vitro* heterotrófico convencional são provocadas pela interação entre dois ou mais fatores (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; CID, 2010). Plantas sob baixa radiação luminosa, ausência de troca gasosa e com alta concentração de açúcar geralmente apresentam pouco pigmento fotossintético, baixa atividade fotossintética e aumento de enzimas antioxidativas (AITKEN-CHRISTIE; KOZAI; SMITH, 2013). Em estudo com propagação *in vitro* de cana de açúcar, Costa, (2012) observou que com o aumento da intensidade luminosa e com permissão de trocas gasosas, houve redução na atividade de enzimas antioxidativas indicando redução do estresse. Além disso, as plantas mostraram aumento significativo do número de folhas e incremento de massa seca.

O sistema de cultivo *in vitro* fotoautotrófico e fotomixotrófico tem apresentado vantagens quando comparado ao sistema convencional heterotrófico. Plântulas da bromélia *Billbergia zebrina* sob condições de cultivo fotoautotrófico, apresentaram condições anatômicas e fisiológicas mais adequadas, quando comparadas com plântulas crescendo *in vitro* sob condições de cultivo convencional heterotrófico (MARTINS et al., 2015a; 2016a). Além disso, a utilização da técnica de cultivo fotoautotrófico induz as plântulas a um comportamento positivo alinhado com as características anatômicas e fisiológicas adequadas, para com isso, elevar a porcentagem de plantas que sobrevivem ao processo de aclimatização em *ex vitro* (CID, 2010; KOZAI, 2012; AITKEN-CHRISTIE; KOZAI; SMITH, 2013; MARTINS et al., 2015b).

Durante o cultivo *in vitro*, o uso de fitorreguladores em diferentes concentrações, diferentes tipos e diferentes combinações na etapa de micropropagação das plantas, é muito comum. Mesmo tendo fundamental importância nos processos de propagação *in vitro*, os fitorreguladores podem interferir no metabolismo normal, ocasionando desordens anatômicas e fisiológicas nas plantas micropropagadas (KOZAI, 2012). Estudando o efeito da concentração do fitorregulador 6-benzilaminopurina no crescimento *in vitro* e no aparato fotossintético de *Solanum melongena*, Wu e outros (2012) verificaram que com o aumento da concentração do fitorregulador, maiores foram as desordens anatômicas nas plantas micropropagadas, sendo estas verificadas ao reduzir o comprimento da planta, o diâmetro do talo, a massa fresca da parte aérea e massa fresca de raiz. Através das medidas de fluorescência da clorofila *a*, foi demonstrado que com o aumento da concentração do fitorregulador, a produção quântica máxima do fotossistema II (F_v / F_m) e a potencial eficiência fotoquímica do fotossistema II (F_v / F_0) foram significativamente baixos.

O acúmulo de etileno no interior dos frascos é muito comum durante o cultivo heterotrófico e as respostas das plantas *in vitro* ao acúmulo incluem alongamento anormal do caule e aumento do diâmetro das células mesmo em presença de luz (SANTOS, 2009), senescência (OLIVEIRA et al., 2007), aumento do número de estômatos nas folhas e presença de estômatos anormais (SANTANA et al., 2008).

Outras desordens anatômicas e fisiológicas das plantas podem ser provocadas pela alta umidade relativa e pelo aumento de sacarose no meio. A alta umidade relativa pode levar ao desenvolvimento anormal de folhas, elevação do número de estômatos, brotos com hiperhidricidade e supressão da transpiração, interferindo no crescimento e desenvolvimento das plantas (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997; VASIL, 2012). Já o aumento da adição de sacarose causa retardo na morfogênese, clorose e necrose das folhas, redução da concentração de clorofila, acúmulo de amido e desordens fisiológicas como a vitrificação (YASEEN et al., 2013; MARTINS et al., 2016a).

2.8 Aclimatização *ex vitro*

Após o período de propagação *in vitro*, as plantas devem possuir capacidade de sobreviverem em condições naturais de cultivo. Por isso, o momento crucial para o sucesso de um cultivo *in vitro* é o momento da etapa de aclimatização das plantas. Ou seja, quando as plantas saem do

cultivo *in vitro* e são transferidas para uma casa de vegetação ou condição *ex vitro*. Neste momento, o índice de sobrevivência de algumas espécies é baixo, configurando como um grave problema na micropropagação de plantas (AOYAMA; GONTIJO; FARIA, 2012; TAVARES et al., 2015).

Na fase de transferência do cultivo *in vitro* para o *ex vitro*, a planta passa de um ambiente controlado, com baixa transpiração devido à baixa luminosidade e a alta umidade relativa, para um ambiente que exige um incremento do fluxo transpiratório, ficando assim, suscetível ao estresse hídrico (CID, 2010). Além disso, a planta sai de um ambiente heterotrófico em que depende de um suprimento exógeno de energia (açúcar adicionado ao meio) e de uma alta disponibilidade de nutrientes, para um estado autotrófico, no qual a planta precisa realizar a fotossíntese e incrementar rapidamente a absorção de nutrientes para sobreviver (KOZAI, 2012; AITKEN-CHRISTIE; KOZAI; SMITH, 2013).

O sucesso do processo de aclimatização das plantas vindas recentemente do cultivo *in vitro* está relacionado intimamente com suas características anatômicas e fisiológicas. As raízes devem estar bem desenvolvidas (SILVA et al., 2008), os feixes vasculares funcionais (MAYER et al., 2008), tecidos lignificados e firmes (MARTINS et al., 2015a), folhas com parênquimas e cutículas espessados (SILVA et al., 2016), estômatos funcionais (FIGURA 1) (SANTANA et al., 2008), densidade estomática baixa (MARTINS et al., 2014) e um aparato fotossintético fisiologicamente eficiente (CASSANA et al., 2008). Estas são condições frequentemente citadas como sendo de maior relevância para o sucesso na etapa de transição das plantas do *in vitro* para a aclimatização em *ex vitro*.

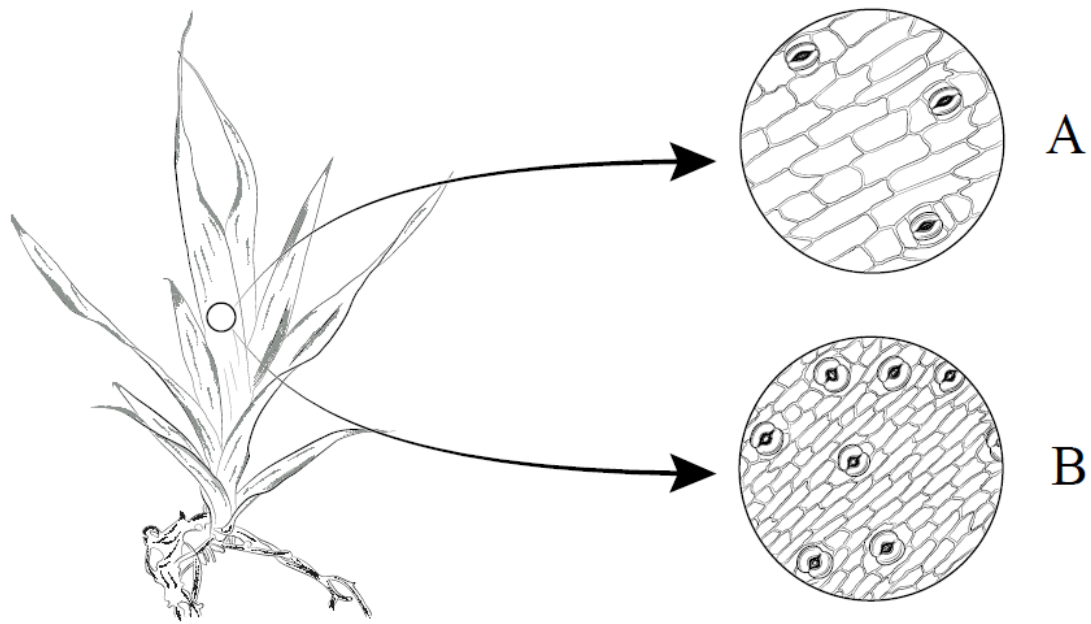


Figura 1: Detalhe de estômatos tetracíticos da epiderme abaxial de *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) durante cultivo *in vitro*. Na representação A, os estômatos mantêm forma típica conservando a funcionalidade estomática. No detalhe B, há alteração na morfologia típica reduzindo a funcionalidade.

É importante ressaltar aqui, qual o melhor momento para fazer a mudança das plantas do cultivo *in vitro* para a aclimatização em *ex vitro*. Neste caso, alguns aspectos devem ser considerados como o tamanho das plantas, a presença de raízes o tempo de cultivo. O tamanho das plantas é o parâmetro mais relatado, pois durante o cultivo *in vitro* o crescimento é limitado pelo espaço disponível dos vasos que em geral é o que define o momento da transferência. Contudo, o tempo de cultivo também é importante, pois um tempo de permanência menor das plantas *in vitro*, reduz os custos de produção e reduz as chances de variação somaclonal ocasionadas pelas múltiplas replicações das plantas cultivadas (AOYAMA; GONTIJO; FARIA, 2012).

2.9 Cultivo *in vitro* de *Aechmea blanchetiana*

Apesar do uso recente da espécie *Aechmea blanchetiana* como modelo experimental, diversos trabalhos tem sido publicados tendo como base as respostas desta espécie durante cultivo *in vitro*. Os primeiros trabalhos *in vitro* surgiram a partir da primeira década deste século, e tinham como objetivo descrever o processo de micropropagação e avaliar respostas

fisiológicas das plantas no crescimento e desenvolvimento durante o cultivo *in vitro* (KANASHIRO, 2005; GALVANESE et al., 2007; KANASHIRO et al., 2007).

Além destes trabalhos já realizados com a espécie, vários outros envolvendo respostas *in vitro* e durante a aclimatização também foram desenvolvidos. A maior parte dos trabalhos foi realizada com intuito de avaliar as respostas fisiológicas da espécie (CHU et al., 2010; GIAMPAOLI et al., 2012; ZAMPIERI et al., 2012; TAVARES et al., 2015). Entretanto, são encontrados trabalhos com germinação de sementes (SANTA-ROSA et al., 2013; COUTO et al., 2016) e com análise de estrutura foliar durante o processo de aclimatização em *ex vitro* (TAVARES et al., 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estabelecimento *in vitro*

Frutos maduros de várias plantas de *A. blanchetiana* foram coletados aleatoriamente na restinga de Guriri, São Mateus, ES, sendo suas sementes extraídas manualmente em laboratório. As sementes foram imersas em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5%) diluída a 50% (v/v) por 30 minutos para desinfestação. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada previamente autoclavada para a remoção do excesso da solução desinfestante (MARTINS et al., 2015a). Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais, suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Os procedimentos de desinfestação e inoculação foram realizados em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação das sementes, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 2°C, iluminada com lâmpadas fluorescentes que fornecem 90 µmol m⁻² s⁻¹ de radiação luminosa e fotoperíodo de 16 horas.

3.2 Cultivo *in vitro*

Como explantes foram utilizadas plantas de *Aechmea blanchetiana* com 60 dias de idade e 2 ± 0,5 cm de comprimento, obtidas por meio da germinação das sementes. As plantas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 ml de meio MS líquido estacionário suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6-benzilaminopurina (BAP) ou 6-furfurilaminopurina (KIN) nas concentrações: 0, 5, 10, 15 ou 20 µM. O experimento foi conduzido com um explante por tubo de ensaio. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após inoculação em câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento por 60 dias a 25 ± 2°C, iluminada com lâmpadas fluorescentes que fornecem 90 µmol m⁻² s⁻¹ de radiação luminosa e fotoperíodo de 16 horas.

3.3 Análise da taxa de multiplicação.

Para analisar a taxa de multiplicação, 15 plantas por tratamento foram coletadas aleatoriamente e divididas em três parcelas. Foi contado o número de brotos por planta, e a massa fresca foi determinada por meio de balança analítica.

3.4 Análise da cinética da fluorescência da clorofila *a*

Para analisar o aparato fotossintético, seis plantas por tratamento foram utilizadas. As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas aos 60 dias de exposição às citocininas. As leituras foram realizadas na terceira folha (a partir do centro da roseta) entre as 08:00 e 09:00 h com auxílio de um fluorômetro portátil Handy PEA (Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK). Previamente as leituras, as folhas foram adaptadas ao escuro utilizando cliques foliares por 30 minutos. A partir da fluorescência transiente OJIP foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995) (Tabela 1).

TABELA 1: ABREVIACÕES DOS PARÂMETROS, FÓRMULAS E DESCRIÇÃO DOS DADOS DERIVADOS DA FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE DA CLOROFILA A.

(continua)

Parâmetros de fluorescência	Descrição
Parâmetros técnicos	
F_0	Florescência inicial.
F_m	Fluorescência máxima.
F_v	Fluorescência variável.
F_t	Fluorescência no tempo t após o início da iluminação actínica.
$F_{20\ \mu s}$	Sinal de fluorescência mínima medida aos 20 μs (corresponde ao F_0)
$F_{300\ \mu s}$	Fluorescência medida no tempo de 300 μs após o início da iluminação actínica.
$F_J = F_{2ms}$	Fluorescência medida no tempo de 2ms após o início da iluminação actínica.
$F_I = F_{30ms}$	Fluorescência medida no tempo de 30ms após o início da iluminação actínica.
$F_P = F_{300ms} \approx F_m$	Fluorescência medida no tempo de 300ms após o início da iluminação actínica.

TABELA 1: ABREVIACÕES DOS PARÂMETROS, FÓRMULAS E DESCRIÇÃO DOS DADOS DERIVADOS DA FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE DA CLOROFILA A.

(conclusão)

Parâmetros de fluorescência	Descrição
Parâmetros derivados	
$Area = \int_0^{t_{Fm}} (F_m - F_0) dt$	Área complementar total entre a curva de indução de fluorescência e F_m .
$M_0 = 4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_m - F_0)$	Taxa líquida de fechamento do fotossistema II.
$V_J = (F_{2ms} - F_0)/(F_m - F_0)$	Fluorescência variável relativa ao ponto J (02 ms).
$V_I = (F_{30ms} - F_0)/(F_m - F_0)$	Fluorescência variável relativa ao ponto I (30 ms).
$V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$	Fluorescência variável relativa no tempo t.
$RC/ABS = Chl_{RC}/(1 - Chl_{RC})$	Concentração de centros de reação ativos pelo total de moléculas de clorofila da antena do sistema coletor de luz do fotossistema II.
Rendimentos quânticos	
$\phi P_0 = TR_0/ABS = [1 - (F_0/F_m)] = F_v/F_m$	Produção quântica máxima das reações fotoquímicas primárias em (t = 0).
$\phi E_0 = ET_0/ABS = [1 - (F_0/F_m)] \psi_0 = \phi P_0 \psi_1$	Eficiência quântica da transferência de um elétron da Q_A^- para a cadeia de transporte de elétrons além da Q_A^- em (t = 0).
$\phi D_0 = 1 - \phi P_0 = (F_0/F_m)$	Eficiência quântica de energia de dissipação em (t = 0).
$\delta R_0 = RE_0/ET_0 = (1 - V_I)/(1 - V_J)$	A probabilidade de um elétron que está localizado em transportadores intersistemas, ser capaz de reduzir os aceptores finais de elétrons do lado do FSI.
$\phi R_0 = \phi P_0 \phi E_0 \delta R_0 = RE_0/ABS = \phi P_0(1 - V_I)$	Rendimento quântico para a redução dos aceptores finais de elétrons do lado do fotossistema I.
$\psi E_0 = ET_0/TR_0 = (1 - V_J)$	A probabilidade de um elétron ser transportado para além da Q_A^- .
Índices de desempenho	
$PI_{ABS} = RC/ABS \cdot \phi P_0/(1 - \phi P_0) \cdot \psi E_0/(1 - \psi E_0)$	Índice de desempenho do fotossistema II.
$PI_{total} = PI_{ABS} \cdot \delta R_0/(1 - \delta R_0)$	Índice de desempenho total.

Fonte: GOLTSEV et al., 2016.

3.5 Caracterização da funcionalidade estomática

A caracterização da funcionalidade estomática foi realizada em cinco plantas coletadas aleatoriamente de cada tratamento. As plantas foram previamente fixadas em FAA 50%, 0,5/0,5/9 (formaldeído, ácido acético e etanol) por 48 horas e armazenadas em álcool 70% (JOHANSEN, 1940). As secções paradérmicas foram realizadas na região mediana do limbo foliar da primeira folha completamente expandida e, com o auxílio de pinça de aço, as secções foram retiradas. As secções foram clarificadas com solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) a 50% (v/v). Posteriormente as secções foram coradas em solução de safranina (1%) (BUKATSCH, 1972), sendo utilizada glicerina a 50% como meio de montagem das lâminas. As secções foram visualizadas e fotografadas usando um microscópio de luz (LEICA DM 1000 acoplado a câmera LEICA ICC50 HD, Wetzlar, Alemanha). As fotomicrografias das secções paradérmicas foram feitas em quatro campos para cada

repetição. O software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) foi utilizado para medir as células nas fotomicrografias das secções paradérmicas. A funcionalidade estomática foi determinada por meio da razão entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial calculados em quatro estômatos por fotomicrografia.

3.6 Análise estatística

O experimento foi montado em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial contendo dois tipos de citocininas (BAP e KIN) X cinco concentrações (0, 5, 10, 15 ou 20 μM). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias foram comparadas por análise de regressão polinomial e teste Tukey a 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros fitotécnicos

A concentração e o tipo de citocinina empregados no meio de cultivo influenciaram diretamente nas respostas morfogênicas de *A.blanchetiana* durante a multiplicação *in vitro* (FIGURA 2). Não houve interação entre os tipos de citocininas estudadas. Na ausência de citocinina exógena no meio de cultivo (0 μM de BAP e 0 μM de KIN; controles), não foi verificada a indução de brotos laterais nos explantes. Contudo, nos meios que foram suplementados com BAP a formação de brotos na base das plantas foi observada. O brotamento (%), o número de brotos e massa fresca por explante apresentaram relação quadrática positiva com a adição de BAP nos meios de cultivo. Através da análise de regressão, o valor de 14,14 μM de BAP foi estimado o ideal para promover a produção de brotos. Por outro lado, as plantas cultivadas com KIN não apresentaram formação de brotos independentemente da concentração utilizada (FIGURA 2A e B). O incremento significativo da massa fresca foi observado nos explantes cultivados na presença de BAP. A massa fresca das plantas cultivadas com KIN não diferiu entre si e foram iguais ao controle (FIGURA 2C).

4.2 Análise da cinética da fluorescência da clorofila *a* e teste-JIP

Os tipos e as concentrações das citocininas estudadas influenciaram de forma independente no desempenho do aparato fotossintético aos 60 dias de exposição aos fitorreguladores. As curvas da fluorescência da clorofila *a* foram analisadas e elas apresentaram a forma polifásica típica, evidenciando que as amostras estavam fotossinteticamente ativas. A suplementação com citocininas, independente do tipo, induziu o decréscimo de fluorescência máxima (F_m). Contudo, o decréscimo de F_m foi mais acentuado nas plantas cultivadas com KIN em relação aquelas cultivadas com BAP (FIGURA 3A-B). Os dados de BAP e KIN foram normalizados entre os pontos 20 μs e 1s [$V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$] e mostrados como diferenças cinéticas dos tratamentos em relação aos controles (FIGURA 3C-D). Foi observada banda negativa apenas nas plantas cultivadas com 5 μM de BAP. As plantas cultivadas nas demais concentrações de BAP e KIN mostraram curvas positivas (FIGURA 3C). Quando comparadas com o controle,

as amplitudes das bandas positivas foram maiores em plantas crescidas em meio suplementado com KIN (FIGURA 3D).

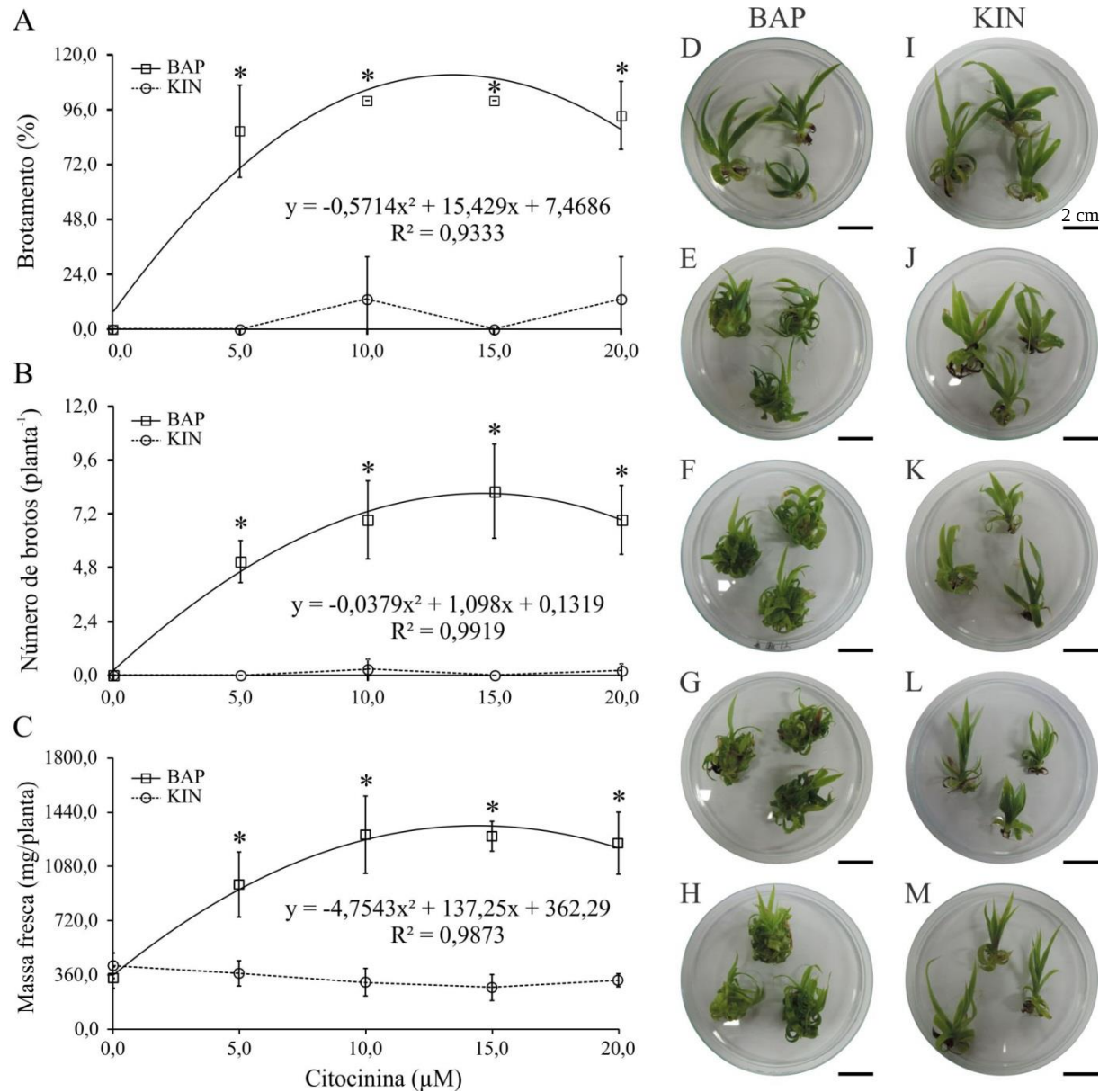


Figura 2. Brotamento (%) (A), número de brotos (B) e massa fresca (mg) (C) de *Aechmea blanchetiana* em função das concentrações de citocininas e aspecto visual dos explantes (D-M) durante a fase de multiplicação *in vitro*. Para cada concentração de citocinina (µM) analisada, as médias seguidas por asterisco não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

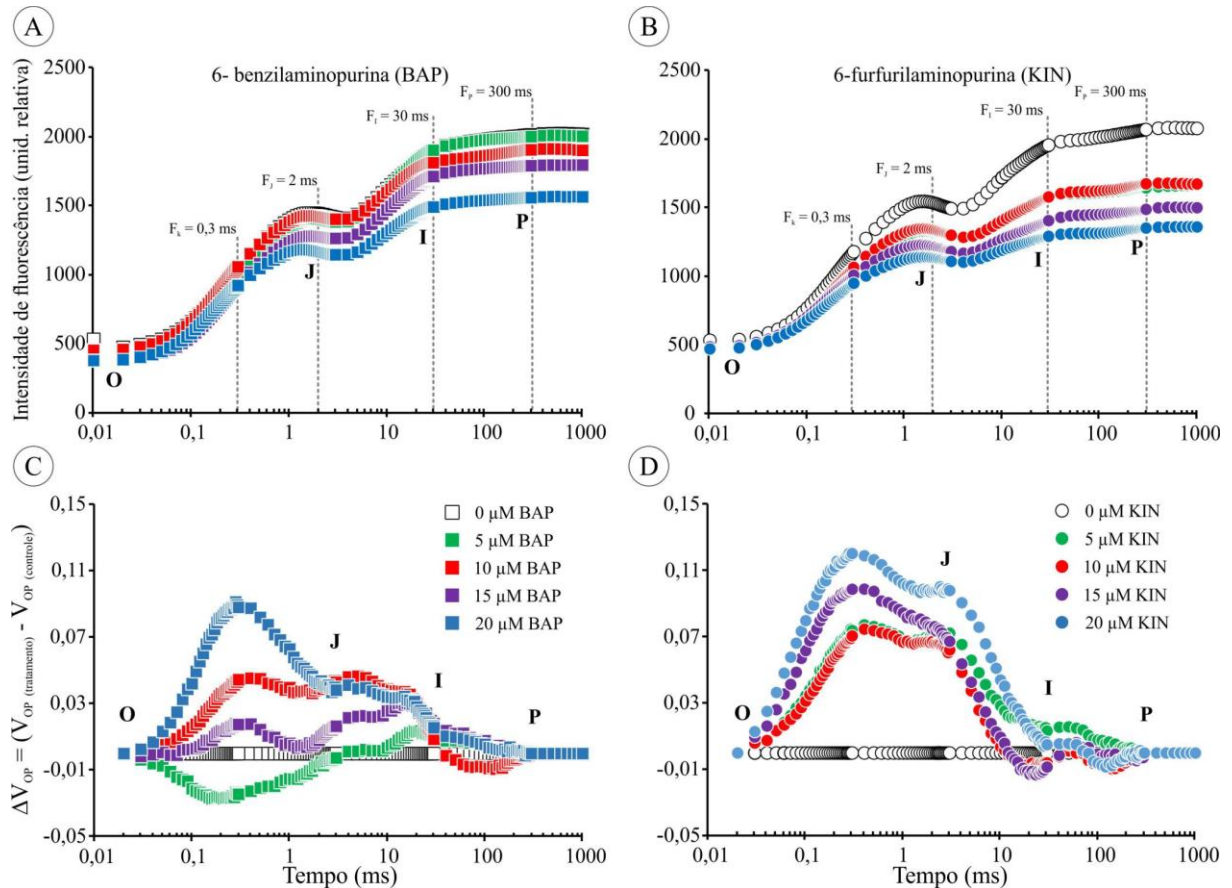


Figura 3. Fluorescência transiente da clorofila *a* de *Aechmea blanchetiana* durante o cultivo *in vitro* em função dos tipos e concentrações de citocininas. (A-B) Intensidade da fluorescência; (C e D) Diferenças cinéticas da fluorescência variável (ΔV_{op}).

Os dados de fluorescência da clorofila *a* entre os pontos O (20 μ s) e K (300 μ s), entre os pontos O (20 μ s) e J (2 ms) e, entre os pontos O (20 μ s) e I (30ms) foram normalizados e apresentados como diferenças cinéticas, as quais permitem a visualização das bandas L, K e J respectivamente. Dentre os tratamentos com BAP (FIGURA 4A, C e E), apenas nas plantas cultivadas com cinco μ M foram observadas a formação de bandas L, K e J negativas bem definidas. O cultivo *in vitro* com KIN induziu a formação de bandas L, K e J positivas, sendo verificado o incremento na amplitude das bandas em função do aumento da concentração (FIGURA 4B, D e F).

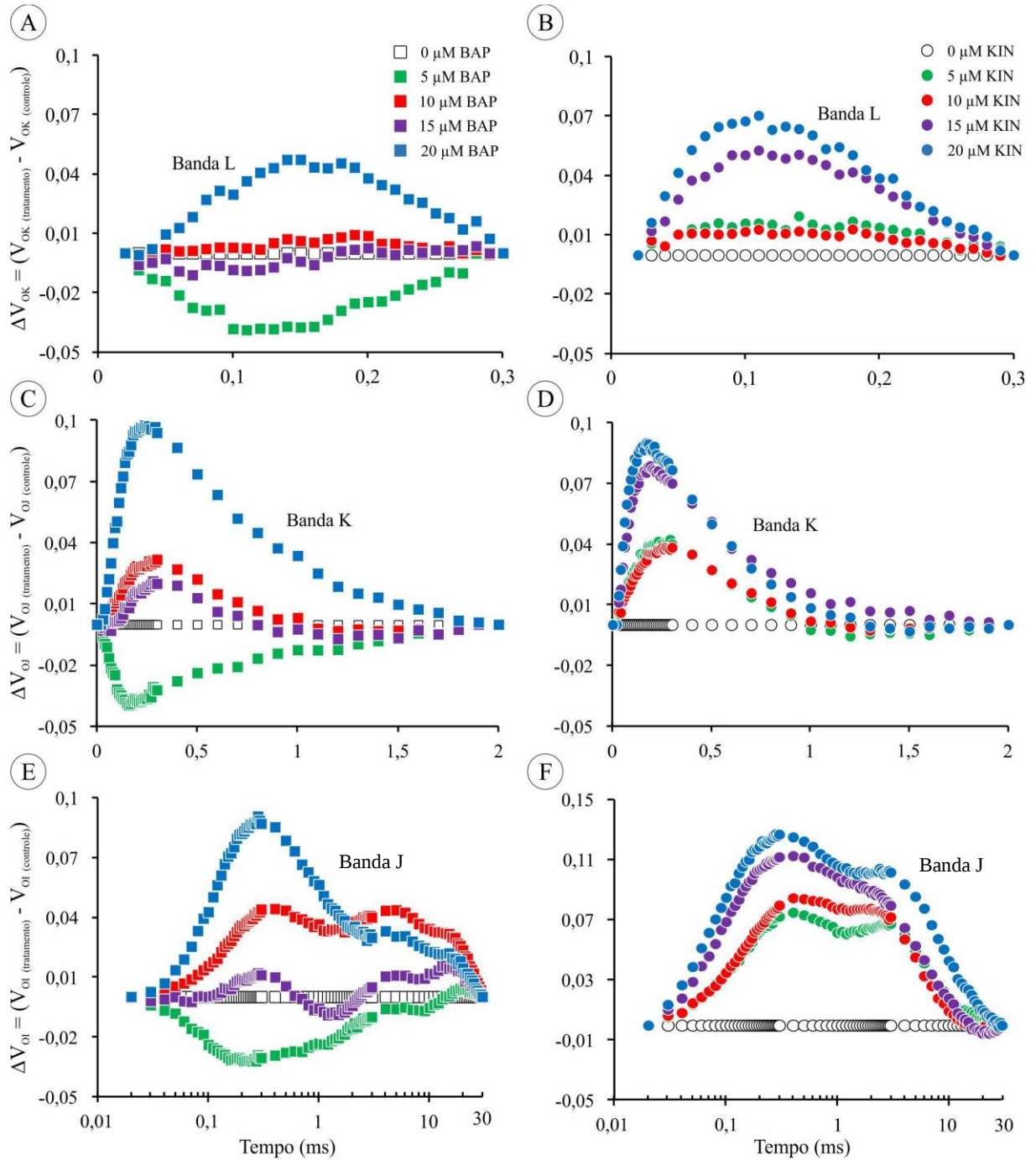


Figura 4. Diferenças cinéticas da fluorescência relativa de *Aechmea blanchetiana* durante os passos 0 ao K = $\Delta V_{0k} = V_{0k} \text{ (tratamento)} - V_{0k} \text{ (controle)}$ (A e B); 0 ao J = $\Delta V_{0j} = V_{0j} \text{ (tratamento)} - V_{0j} \text{ (controle)}$ (C e D); 0 ao I = $\Delta V_{0i} = V_{0i} \text{ (tratamento)} - V_{0i} \text{ (controle)}$ (E e F).

Os tipos e as concentrações de citocininas no meio influenciaram nos parâmetros do teste-JIP, contudo, os fatores influenciaram de forma independente. Os parâmetros do teste-JIP foram apresentados em função do tipo de citocinina na Tabela 2 e, em função das concentrações, os dados foram normalizados em função do controle (0 μM) e apresentados na Figura 5. Nos parâmetros técnicos (F_0 , Área e M_0) os valores para a fluorescência inicial (F_0) não foram

significativos, a Área reduziu e M_0 aumentou conforme aumento da concentração (FIGURA 5). Considerando o tipo de citocinina empregada, BAP produziu os menores valores nos três parâmetros avaliados (TABELA 2). A densidade dos centros de reação (RC/ABS) reduziu conforme aumento da concentração e menores valores foram verificados para KIN.

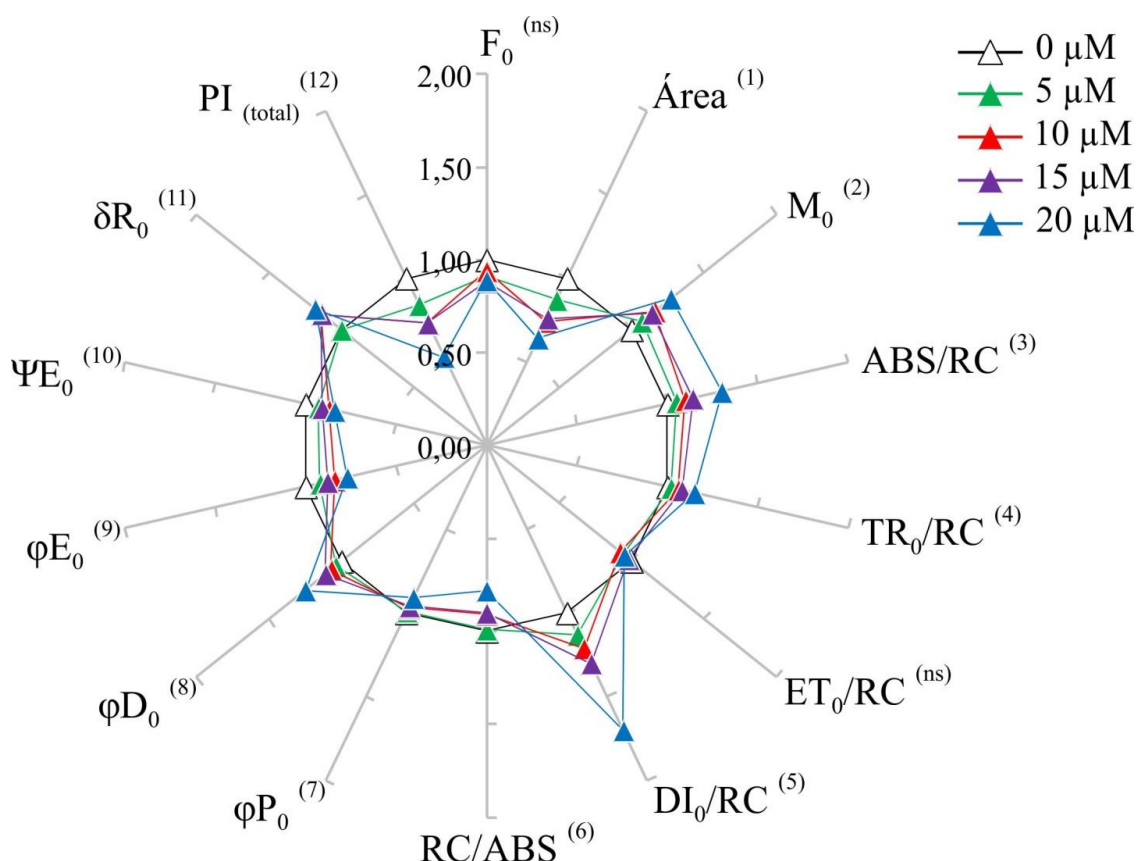


Figura 5. Parâmetros do teste-JIP, em função da concentração de citocininas, para as plantas de *Aechmea blanchetiana* durante o cultivo *in vitro*. Os dados foram normalizados com o controle (0µM de citocinina) igual a 1. ^{ns} = Médias não diferem entre si segundo o teste F; ⁽¹⁾ = $y = -401,548x + 23180,33$ $R^2 = 91,2$; ⁽²⁾ = $\hat{y} = 0,018x + 1,46$, $R^2 = 90,1$; ⁽³⁾ = $\hat{y} = 0,046x + 3,194$, $R^2 = 91,1$; ⁽⁴⁾ = $\hat{y} = 0,017x + 2,316$, $R^2 = 93,6$; ⁽⁵⁾ = $\hat{y} = 0,029x + 0,878$, $R^2 = 88,4$; ⁽⁶⁾ = $\hat{y} = -0,003x + 0,317$, $R^2 = 91,1$; ⁽⁷⁾ = $\hat{y} = -0,003x + 0,727$, $R^2 = 91,1$; ⁽⁸⁾ = $\hat{y} = 0,003x + 0,273$, $R^2 = 89,9$; ⁽⁹⁾ = $\hat{y} = -0,003 + 0,270$, $R^2 = 85,6$; ⁽¹⁰⁾ = $\hat{y} = -0,003x + 0,369$, $R^2 = 74,9$; ⁽¹¹⁾ = $\hat{y} = -0,33x + 1,500$, $R^2 = 92,8$; ⁽¹²⁾ = $\hat{y} = -0,032x + 1,499$, $R^2 = 92,83$.

Os fluxos específicos de energia (ABS/RC, TR₀/RC e DI₀/RC) mostraram elevação com aumento de concentração de citocininas, enquanto que ET₀/RC não apresentou diferenças significativas para o aumento da concentração ou o tipo de citocinina empregada. Os meios suplementados com KIN produziram os valores mais expressivos (TABELA 2).

Nas medidas de rendimento quântico (ϕP_0 , ϕE_0 e ϕD_0), o aumento da concentração de citocininas, elevou apenas o valor da produção quântica da energia de dissipação (ϕD_0). Foi

verificada redução dos valores de ϕP_0 , ϕE_0 com o aumento da concentração de citocininas, principalmente quando empregado KIN no meio de cultivo. Os valores de δR_0 foram maiores nas plantas cultivadas com KIN, independentemente da concentração usada. Na probabilidade da energia aprisionada mover um elétron para dentro da cadeia de transporte de elétrons para além da Q_A^- (ΨE_0) e no índice de desempenho total ($PI_{(total)}$), os valores também decresceram com aumento da concentração. Em meios suplementados com KIN, os valores de ΨE_0 e $PI_{(total)}$ foram menores (FIGURA 5 e TABELA 2).

TABELA 2: PARÂMETROS DA MÉDIA DOS DADOS OBTIDOS PELO TESTE-JIP PARA CITOCININAS (BAP E KIN).

Parâmetros		BAP	KIN
Parâmetros técnicos	F_0	350,80 b	442,40 a
	Área	17733,23 b	20596,47 a
	M_0	1,48 b	1,81 a
Fluxos específicos de energia	ABS/RC	3,17 b	4,14 a
	TR_0/RC	2,34 b	2,63 a
	ET_0/RC	0,82 b	0,86 a
	DI_0/RC	0,83 b	1,50 a
Densidade de centros de reação	RC/ABS	0,32 a	0,25 b
Produção quântica	ϕP_0	0,74 a	0,64 b
	ΨE_0	0,37 a	0,32 b
	ϕE_0	0,28 a	0,21 b
	ϕD_0	0,26 b	0,35 a
	δR_0	0,191 b	0,298 a
Índice de desempenho	PI (total)	1,35 a	0,99 b

Nota: Valores acompanhados por letras diferentes na mesma linha referem-se a diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.3. Análise da funcionalidade estomática

Foi verificada modificação na morfologia estomática típica caracterizada pela redução na razão diâmetro polar / diâmetro equatorial dos estômatos da epiderme abaxial de *A. blanchetiana*. A alteração morfológica dos estômatos ocorreu apenas em função da concentração de citocininas no meio de cultivo, não sendo alterada pelo tipo de citocinina empregada. A funcionalidade estomática apresentou uma relação negativa com o aumento da concentração de citocinina (FIGURA 6-7)

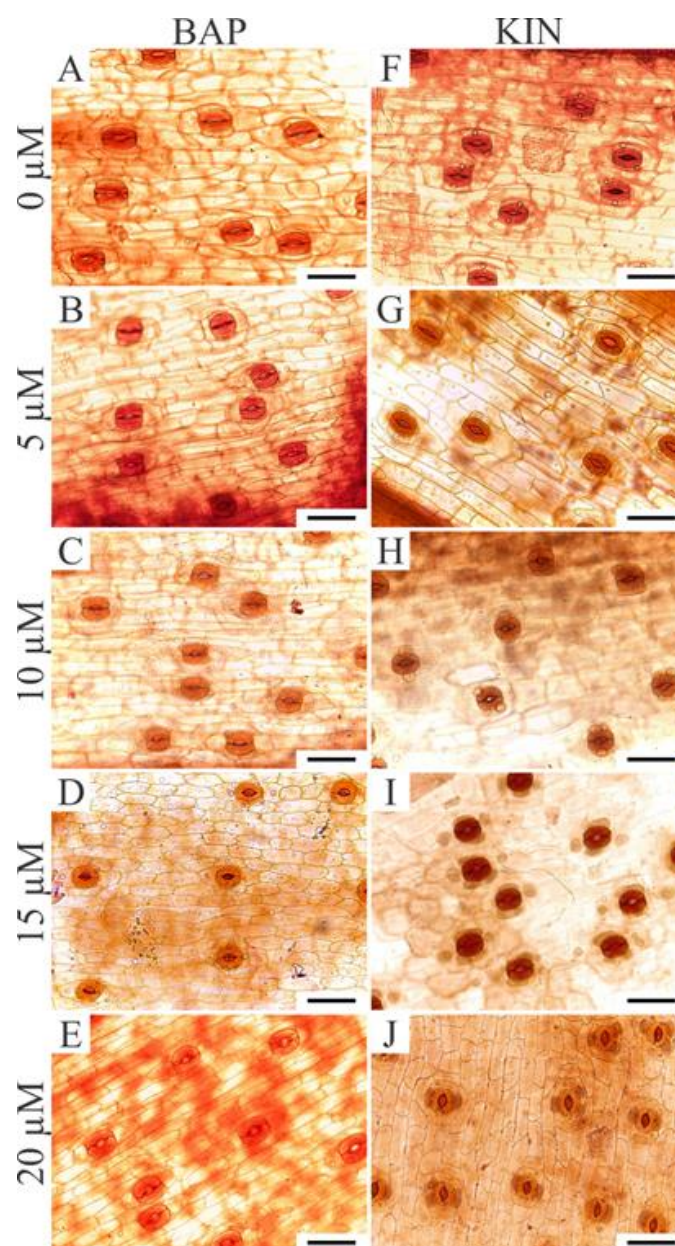


Figura 6. Secções paradérmicas de folhas de *Aechmea blanchetiana* em função das concentrações (0, 5, 10, 15 e 20 μM) de BAP (A-E) e KIN (F-J) durante a fase de multiplicação *in vitro*.

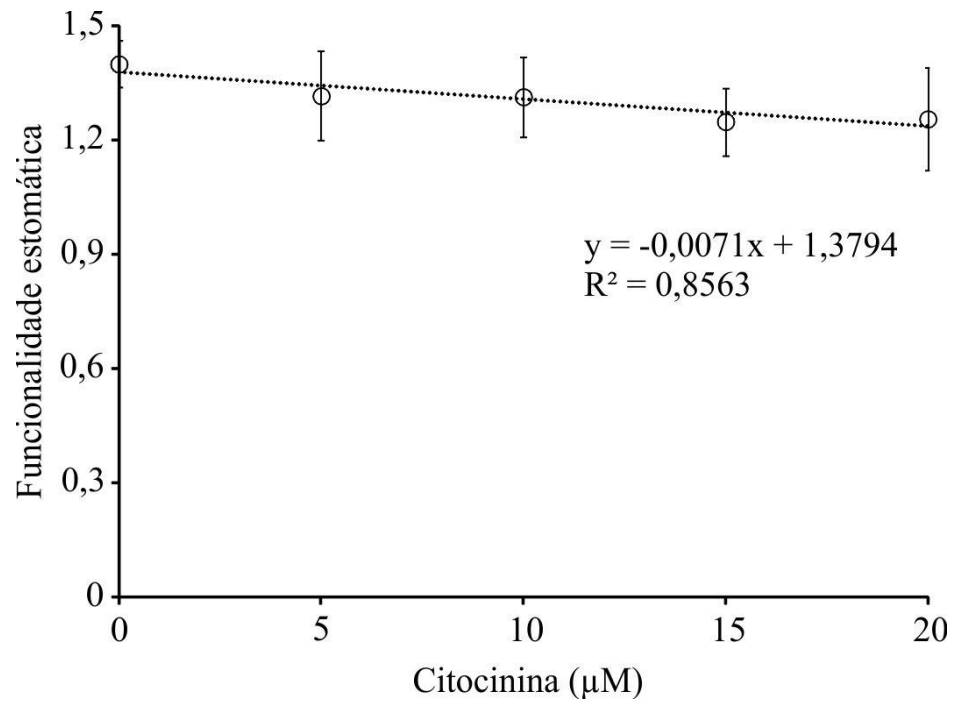


Figura 7. Funcionalidade estomática de explantes de *Aechmea blanchetiana* em função da concentração de citocininas durante a fase de multiplicação *in vitro*.

5. DISCUSSÃO

O uso da cinetina (KIN) mostrou não ser eficiente para promover a multiplicação *in vitro* de *A. blanchetiana*. A baixa eficiência de KIN na indução de brotos laterais em espécies da família Bromeliaceae já foi documentada (SILVA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2009; MARTINS et al., 2014; BADR-ELDEN, 2016). Essa baixa taxa de multiplicação de *A. blanchetiana* em presença de KIN adicionada ao meio de cultivo pode estar relacionada com a atividade do sistema enzimático de clivagem do grupo furfuril da 6-furfurilaminopurina como sugerido por Martins e outros (2014). Um exemplo para esse grupo de enzimas é a citocinina oxidase/desidrogenase que catalisa a degradação de citocininas (NISLER et al., 2016). Tal ação enzimática poderia reduzir ou inibir a ação de KIN na quebra da dominância apical, impedindo a formação de novos brotos.

O alto número de brotos apresentado pelas plantas tratadas com BAP parece estar relacionado à sua alta atividade na parte aérea quando comparado a outras citocininas (BAKHTIAR; MIRJALILI; SONBOLI, 2016). Todavia, ao elevar a concentração há aumento do estresse provocado por esse fitorregulador; como evidenciado pelas análises da fluorescência da clorofila *a*. Fatores de estresse exógenos ativam genes que alteram o balanço hormonal endógeno de citocininas (MACKOVÁ et al., 2013). O estresse provocado pela elevação da concentração de diferentes resíduos de citocininas pode ativar genes relacionados à síntese de citocininas oxidases/desidrogenases que se ligam a sítios específicos do substrato realizando sua catálise (KOPEČNÝ et al., 2016).

A redução do número de brotos observada em concentrações acima de 14,14µM de BAP pode estar relacionada à resposta das plantas ao aumento do estresse. Para os valores de BAP acima dessa concentração, possivelmente há ativação dos genes responsáveis pela síntese de enzimas citocininas oxidases/desidrogenases. Assim, estas enzimas catalisam a BAP reduzindo a sua atividade e as plantas em resposta, emitem menos brotos. Além dos efeitos na taxa multiplicação *in vitro*, foi claramente demonstrado como os tipos e concentrações de citocininas influenciaram, de forma geral, negativamente sobre o aparato fotossintético de *A. blanchetiana*.

Alterações na fluorescência inicial (F_0) podem estar relacionadas às perdas de energia nos pigmentos da antena do FSII (GOLTSEV et al., 2016). Em nosso trabalho, as plantas cultivadas com KIN tiveram valores superiores de F_0 em relação ao BAP. Esse aumento em

F_0 pode ser um indicativo de uma inibição parcial do centro de reação do FSII, que inibe o fluxo de elétrons de quinona A (Q_A) para quinona B (Q_B), diminuindo a eficiência de energia capturada no FSII (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004). Por outro lado, a exposição direta as citocininas no meio induziram a um decréscimo no ponto P (F_m), independentemente do tipo.

A intensidade da fluorescência máxima (F_m) é um fator importante para a avaliação da eficiência fotossintética das plantas. Do ponto de vista prático, F_m representa o momento em que todos os centros de reação estão fechados, isto é, quando todos os aceptores de elétrons iniciais, intermediários e finais estão reduzidos (KALAJI et al., 2016). Em *A. blanchetiana* a redução de F_m foi inversamente proporcional ao aumento de concentração para todos os tratamentos com citocininas. Em condições de estresse, as plantas normalmente inibem a redução do *pool* de PQ e os aceptores de elétrons em torno de FSI e, isso é indicado por uma redução no F_m (KALAJI et al., 2014; MARTINS et al., 2015b). A redução em F_m pode indicar um possível desvio energético para a dissipação não fotoquímica (DNF) correlacionado aos processos de fotoproteção (MURCHIE; LAWSON, 2013).

O aumento no F_0 para os tratamentos com KIN concomitantemente com a redução no F_m levou a redução na amplitude de F_v ($F_m - F_0$). Um menor F_v levou a redução do rendimento das reações fotoquímicas primárias ($\phi P_0 = F_v / F_m$). Reduções no ϕP_0 implicam em uma eficiência reduzida do processo de conversão fotoquímica, o que pode sugerir possíveis danos e/ou inibição da atividade FSII (MARTINS et al., 2015b).

As amplitudes positivas das fases O-J e J-I nos tratamentos indicaram que as plantas de *A. blanchetiana* tiveram a capacidade comprometida de reduzir fotoquimicamente Q_A . As propriedades cinéticas necessárias para a redução/oxidação do *pool* de plastoquinona (PQ) diminuíram em função da concentração de citocininas adicionadas no meio. A fase O-J indica a reação de redução da Q_A a partir da feofitina (Pheo), o qual é considerado oceptor primário de elétrons nos centros de reação (CRs) (KALAJI et al., 2014). O passo J-I das curvas de diferenças cinéticas revelam mudanças no fluxo de elétrons a partir da Q_A^- , passando pela Q_B^- , até a redução de plastoquinona (PQ) (PORCAR-CASTELL et al., 2014). A amplitude das bandas de diferenças cinéticas neste ponto reflete o tamanho do *pool* de PQ. Bandas com amplitudes positivas indicam redução do tamanho do *pool* de PQ. As bandas O-J e J-I negativas observadas em plantas cultivadas com 5 μ M de BAP indicam que essas plantas mantiveram a capacidade de reduzir fotoquimicamente Q_A e tiveram as propriedades cinéticas necessárias para redução/oxidação do *pool* de PQ (MARTINS et al., 2015b).

O aparecimento das bandas-L e bandas-K positivas são bons indicadores para identificar distúrbios fisiológicos antes de manifestações visuais de danos (OUKARROUM et al., 2009). Banda-L positivas indica distúrbio nas membranas dos tilacoides reduzindo a conectividade entre os CRs do FSII. Contudo, alta conectividade geralmente ocorre quando valores da banda-L são de amplitudes negativas, promovendo um melhor aproveitamento da energia de excitação e uma maior estabilidade do sistema (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004; YUSUF et al., 2010; MARTINS et al., 2015b). A banda-K positiva é um indicador da inativação do complexo de evolução do oxigênio (CEO) (grupo Mn_4O_xCa) ligado à proteína D_1 do CR do FSII e/ou aumento do tamanho funcional do sistema antena do FSII (GOVINDJEE; MESSINGER; WHITMARSH, 2010; YUSUF et al., 2010). Bandas-K positivas podem representar um desequilíbrio entre o fluxo de elétrons que sai do CR através do doador primário (P680) e o fluxo de elétrons que chega ao CR através do doador lateral de elétrons (resíduo de tirosina Y_Z) (STRASSER, 1997). Por outro lado, bandas-K negativas sugerem melhor fluência dos elétrons liberados da oxidação da água no grupo Mn_4O_xCa até a $P680^+$. Aqui verificamos que, dentre as plantas expostas à citocininas, apenas as cultivadas com cinco μM de BAP mantiveram a conectividade entre os centros de reação e a atividade do CEO. Isso indica que houve um balanço entre os elétrons do lado acceptor e doador do FSII. Essas condições conduzem a uma maior redução de PQ, mensurada pelo ΔV_{OI} , isto é, a magnitude da sequência de eventos da captura de éxcitons pelo FSII à redução de PQ (YUSUF et al., 2010).

A Área acima das curvas de fluorescência foi medida e ela corresponde a área formada no gráfico logo após a detecção de F_0 até o aparecimento de F_m (STRASSER et al., 2000). A redução na Área acima das curvas OJIP implica em diminuição da eficiência fotossintética total e do ganho de produtividade (KALAJI et al., 2016). O declínio verificado na Área ao aumento da concentração de citocininas infere ineficiência no processo de transporte de elétrons. Essa redução da eficiência fotossintética observada por meio dos valores da Área pode ser deduzida pelos valores de M_0 ($M_0 = TR_0/RC - ET_0/RC$) que representa a taxa máxima de fechamento do FSII. Isto equivale à redução de Q_A na fase inicial, enquanto que as moléculas de Q_A^- podem ser reoxidadas em estágios posteriores por transportadores de elétrons localizados para além de Q_A na cadeia de transporte de elétrons (GOLTSEV et al., 2016). O aumento dos valores de M_0 em função da concentração de citocininas pode estar relacionado com uma maior necessidade de energia aprisionada para o fechamento do CRs. Os valores da Área e de M_0 indicaram que houve redução da atividade fotoquímica primária

ao elevar a concentração de citocininas. Essa redução é ainda mais acentuada quando as plantas são expostas à KIN.

Nossos resultados indicaram que a suplementação de citocininas no meio de cultivo pode diminuir a eficiência da fotossíntese por CR. Contudo, os efeitos foram menos deletérios quando as plantas foram expostas ao BAP. Um aumento no fluxo de energia absorvida (ABS/RC) resultou em um aumento no fluxo de energia aprisionada (TR_0/RC) e no fluxo de dissipação de energia (DI_0/RC). Esses resultados indicam que alguns CRs estavam inativos e a eficiência por CR foi aprimorada (MENG et al., 2016). Essas alterações foram confirmadas pelo decréscimo em RC/ABS. A inativação de centros de reação pode ser uma indicação de susceptibilidade à fotoinibição (FRANIĆ et al., 2017). O aumento dos valores de ABS/RC seguindo de aumento dos valores de TR_0/RC indica que a antena funcional (a antena que fornece energia de excitação para CRs ativos) aumentou de tamanho (YUSUF et al., 2010). Além disso, o aumento do TR_0/RC pode indicar algum grau de comprometimento do CEO (KALAJI et al., 2014). O incremento da energia absorvida e capturada não resultou no aumento de ET_0/RC , mas um aumento acentuado em DI_0/RC , o que implica que a maior parte da energia foi perdida na forma de calor. Os indicadores de dissipação (ϕD_0 e DI_0/RC) podem sugerir que a dissipação de energia aprisionada poderia ser um mecanismo de proteção à fotodanos (WANG et al., 2016).

Um decréscimo nos valores de ϕE_0 e ΨE_0 e aumento de ABS/RC em resposta ao aumento das concentrações de citocininas indica que houve um desequilíbrio entre a absorção de luz fotossintética e a utilização de sua energia (ZHANG et al., 2016). Decréscimo nos valores de ϕE_0 e ΨE_0 indica que há inibição do transporte de elétrons da Q_A para Q_B , levando ao acúmulo de Q_A (MENG et al., 2016). Dessa forma, mais energia é usada para reduzir Q_A e isso pode ser evidenciado pelo aumento de M_0 (TANG et al., 2015). O aumento do valor de δR_0 implica na eficiência com a qual um elétron pode mover-se a partir dos aceptores de elétrons do intersistema reduzido para aceptores de elétrons finais do FSI (CHEN; CHENG, 2009). Assim, ele é dependente do elétron transferido a partir da PQH_2 para FSI (MATHUR; KALAJI; JAJOO, 2016). Isto sugere que o BAP afetou negativamente o FSI mais do que a KIN e reduziu a eficiência dos elétrons para alcançar os aceptores de elétrons finais do FSI. Contudo, os efeitos de KIN sobre o FSII foram mais severos e comprometeram todo o desempenho do aparato fotossintético, como mostrado pelo $PI_{(Total)}$. O $PI_{(total)}$ representa o potencial das plantas na conservação de energia para o crescimento e para sobrevivência sob condições de estresse (YUSUF et al., 2010). A redução dos valores de $PI_{(total)}$ ao elevar a

concentração de citocininas em plantas de *A. blanchetiana* evidenciou que a capacidade de conservação de energia nestas plantas reduziu. Entretanto, o estresse provocado pelas citocininas nas concentrações estudadas, não comprometeu sua sobrevivência durante o cultivo *in vitro*.

As características anatômicas das superfícies foliares de *A. blanchetiana*, como distribuição estomática restrita à face abaxial, estão de acordo com a descrita em outras espécies da subfamília Bromelioideae (PEREIRA et al., 2013; MARTINS et al., 2015b; MALES; GRIFFITHS, 2017). Durante o cultivo *in vitro*, o emprego de concentrações elevadas de citocininas pode alterar a morfologia dos estômatos, apresentando os ostíolos abertos (GOKHALE; BANSAL, 2009; MARTINS et al., 2014). A redução da funcionalidade estomática de *A. blanchetiana* induzida em função da concentração de citocininas pode afetar negativamente a sua capacidade de controlar a perda de água para o ambiente. O controle da abertura e fechamento dos estômatos é uma condição indispensável para a sobrevivência das plantas em condições de baixa umidade relativa (FANOURLAKIS et al., 2016). Alterações na morfologia típica dos estômatos, como a redução do diâmetro polar, são reportadas como possíveis causas da baixa funcionalidade (MAGALHAES et al., 2016) e, caso tais alterações persistam, pode ocorrer perdas durante a fase de aclimatização.

6. CONCLUSÕES

As citocininas tiveram efeito sobre o aparato fotossintético e na funcionalidade estomática de *A. blanchetiana*, bem como na indução de brotos laterais. Contudo, tais efeitos são modulados pelo tipo e concentração de citocinina empregados no meio de cultivo. A citocinina KIN não foi efetiva na indução de brotos laterais e induziu alterações fisiológicas que comprometeram o bom desempenho do aparato fotossintético das plantas expostas a essa citocinina. O aumento da concentração de citocininas, independente do tipo empregado no meio de cultivo, induziu estresse principalmente no FSII e as novas folhas formadas apresentam baixa funcionalidade estomática. Dessa forma, o emprego de BAP em menores concentrações foi eficiente para quebrar a dominância apical e estimular formação de novos brotos, com menor grau de distúrbios no aparato fotossintético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, Monique Cristine Rodrigues et al. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl.(Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, 2014.

AITKEN-CHRISTIE, Jenny; KOZAI, Toyoki; SMITH, Mary Ann Lila (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Springer Science & Business Media, 3rd edition, p. 574, 2013.

ALCALDE, Maria Bausa. Sobre el cultivo *in vitro* de raices aisladas de berenjena. **Farmacognosia: anales del Instituto José Celestino Mutis**, v. 13, p. 33, 1953.

ALCALDE, María Bausa. **Estudios fisiológicos mediante la técnica del cultivo de raices *in vitro*: contribucion al conocimiento de la formacion de alcaloides en el genero *nicotiana***. Tesis doctoral. Universidad, 1955.

ANACLETO, Adilson; NEGRELLE, Raquel Rejane Bonato. Comércio de bromélias no Paraná. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 185-193, 2013.

ANTONIAZZI, Dirlane et al. Growth regulators, DNA content and anatomy *in vitro*-cultivated *Curcuma longa* seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 32, p. 1711-1725, 2016.

AOYAMA, Elisa Mitsuko et al. Evaluating the effectiveness of the propagation of *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivated *in vitro* and *ex vitro*. **Rodriguésia**, v. 63, n. 2, p. 321-331, 2012.

AOYAMA, Elisa Mitsuko; GONTIJO, Andréia Barcelos Passos Lima; FARIA, Daniele Vidal. Propagação em Bromeliaceae: germinação de sementes e cultivo *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1452-1471, 2012.

ARAÚJO, Dorothy Sue Dunn; LACERDA, Luiz. A natureza das restingas. **Ciência hoje**, v. 6, n. 33, p. 42-48, 1987.

AREMU, Adeyemi O. et al. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 108, n. 1, p. 1-16, 2012.

ARNAO, M. González; ENGELMAN, Florent María Teresa. **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. IICA, San José (Costa Rica). Institut de recherche pour le développement (IRD). Universidad Veracruzana (México). 2013.

ARRABAL, Ricardo. et al. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (LB Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity & Conservation**, v. 11, n. 6, p. 1081-1089, 2002.

ARRIGONI-BLANK, Maria de Fátima et al. *In vitro* germination of seeds and acclimatization of Macambira (*Bromelia laciniosa* Martius ex Schultes f.) seedlings. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 56, n. Suple, p. 68-71, 2014.

ASSIS, Maria Aparecida; MORELLI-AMARAL, Valério Francisco; PIMENTA, Fabricia Pires. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 1, p. 45-54, 2015.

BADR-ELDEN, Awatef M. *In vitro* STORAGE OF SYNTHETIC SEEDS OF *Aechmea fasciata*. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, v. 42, n. 2, 2016.

BAKER, Neil R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 89, 2008.

BAKHTIAR, Ziba; MIRJALILI, Mohammad Hossein; SONBOLI, Ali. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 48-54, 2016.

BENSON, Erica E. Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, p. 163-170, 2000.

BENZING, David. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge University. Press: Cambridge, UK, first edition, v. 690, p. 171, 2000.

BIANCO, Marta del; GIUSTINI, Leonardo; SABATINI, Sabrina. Spatiotemporal changes in the role of cytokinin during root development. **New Phytologist**, v. 199, n. 2, p. 324-338, 2013.

BRITO, Maria Cecília Wey. **Unidades de conservação: intenções e resultados**. Annablume, 2000.

BROWSE, John; XIN, Zhanguo. Temperature sensing and cold acclimation. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 3, p. 241-246, 2001.

BUKATSCH, Franz. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

CARNEIRO, Leonardo A.; MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, v. 2, p. 12-20, 2004.

CARNEIRO, Leonardo. A. et al. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* LB Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. **Plant tissue culture and biotechnology**, v. 4, p. 152-158, 1998.

CARNEIRO, Leonardo. A. et al. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) LB Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, n. 2, p. 79-83, 1999.

CARVALHO, Ana Cristina P. P. et al. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. *In vitro* multiplication of ornamental pineapple by shoot etiolation and regeneration. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.

CARVALHO, Cynthia Christina dos Santos; VIEGAS, Paulo Hercílio Rodrigues. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia**, v. 63, n. 2, 2004.

CASSANA, Francine Ferreira et al. Fluorescência das clorofilas em plantas de batata doce (*Ipomoea batatas* L.) cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 867-869, 2008.

CATENACCI, Lilian S. et al. Diet and Feeding Behavior of *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae) in Degraded Areas of the Atlantic Forest of South-Bahia, Brazil. **International Journal of Primatology**, v. 37, n. 2, p. 136-157, 2016.

CERON, Karoline et al. Potencial medicinal e alimentício da vegetação herbácea terrícola ciliar no sul do Brasil. **Interciencia**, v. 41, n. 6, p. 393, 2016.

CHEN, L.-S.; CHENG, L. Photosystem 2 is more tolerant to high temperature in apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves than in fruit peel. **Photosynthetica**, v. 47, n. 1, p. 112-120, 2009.

CHU, Edison Paulo et al. Effects of auxins on soluble carbohydrates, starch and soluble protein content in *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. **Scientia horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 451-455, 2010.

CID, L. Pedro Barreto. Cultivo *in vitro* de Plantas. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2010.

COELHO, Samuel; CARDOSO-LEITE, Eliana; CASTELLO, Ana Carolina Devides. Composição florística e caracterização sucessional como subsídio para conservação e manejo do PNMCBio, Sorocaba-SP. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, 2016.

COLLI-SILVA, Matheus et al. Registros de espécies vasculares em unidades de conservação e implicações para a lista da flora ameaçada de extinção no estado de São Paulo. **Rodriguésia**, v. 67, n. 2, 2016.

CORREDOR-PRADO, Jenny P. et al. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (LB Smith) LB Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 4, p. 200-209, 2015.

CORREIA, Maria Célia Rodrigues; LIMA, Heloisa Alves de; SILVA, Renata Carolina P. da. Characterization of fruits, seeds and seedlings of species of Clusiaceae from sandy coastal plains (restingas) of Rio de Janeiro State. **Rodriguésia**, v. 64, n. 1, p. 61-73, 2013.

COSTA, Deivid Almeida da et al. **Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar sob o cultivo *in vitro* em diferentes microambientes**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

COSTA-PEREIRA, Raul et al. Monitoramento *in situ* da biodiversidade: proposta para um sistema brasileiro de monitoramento da biodiversidade. **Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2013.

COUTO, Tarcisio Rangel do et al. Germinação *in vitro* e aclimatização de mudas de *Aechmea blanchetiana* (BAKER) LB Smith em diferentes resíduos da agroindústria. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 2016.

DEBERGH, Pierre; MAENE, Ludo. Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. **Parasitica**, 1984.

DIAS, Márcia M. et al. Reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 3, 2011.

DOBRÁNSZKI, Judit; MENDLER-DRIENYOVSKY, Nóra. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 16, p. 1472-1478, 2014.

DROSTE, Annette et al. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

DZIEDZIC, Jowita A.; MCDONALD, Armando G. Mass spectrometry data for *in vitro* protein profiles in early and late stages of Douglas-fir xylogenesis. **Data in brief**, v. 7, p. 1048-1051, 2016.

EBURNEO, L. et al. Anatomy and micromorphometric analysis of leaf *Catasetum x apolloi* Benelli & Grill with addition of potassium silicate under different light sources. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 140-149, 2017.

ENGELMANN, Florent. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. In: **III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 447**. 1996. p. 471-476.

FANOURLAKIS, Dimitrios et al. Improving stomatal functioning at elevated growth air humidity: A review. **Journal of plant physiology**, v. 207, p. 51-60, 2016.

FAY, Michael F. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? **Biodiversity & Conservation**, v. 3, n. 2, p. 176-183, 1994.

FONSECA, Priscila Tavares et al. *In vitro* conservation of *Erythrina velutina* from zygotic embryos. **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, v. 15, 2015.

FONTOURA, Talita; SANTOS, Flavio Antonio Maës dos. Geographic distribution of epiphytic bromeliads of the Una region, Northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 127-131, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Acesso em 04 de setembro de 2016.

FORZZA, Rafaela et al. Coleções biológicas do jardim botânico do rio de janeiro à luz das metas da gspc/cdb: onde estaremos em 2020? **Revista Museologia & Interdisciplinaridade**, v. 5, n. 1, p. 125-141, 2016.

FRANIĆ, Mario et al. Effects of excess cadmium in soil on JIP-test parameters, hydrogen peroxide content and antioxidant activity in two maize inbreds and their hybrid. **Photosynthetica**, p. 1-10, 2017.

GAJDOŠOVÁ, Silvia et al. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2827-2840, 2011.

GALVANESE, Máira Soares et al. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, v. 54, n. 311, p. 63-67, 2007.

GAUTHERET, Roger Jean; LONCHAMP, Robert. **La Culture des tissus végétaux: techniques et réalisations, par MRJ Gautheret,..** Masson et Cie, 1959.

GENTILE, A. et al. The aromatic cytokinin meta-topolin promotes *in vitro* propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, p. 1-11, 2016.

GIAMPAOLI, Pierre. et al. Analysis of tolerance to copper and zinc in *Aechmea blanchetiana* grown *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 1, p. 83-88, 2012.

GODOY, Larissa Ribeiro da Cruz. O financiamento do Sistema Nacional de Unidades de Conservação no Brasil: características e tendências. **id/511525**, 2015.

GOKHALE, Mamta; BANSAL, Yogendra K. Direct *in vitro* regeneration of a medicinal tree *Oroxylum indicum* (L.) Vent. Through tissue culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, 2009.

GOLTSEV, Vitali N. et al. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 63, n. 6, p. 869-893, 2016.

GOVINDJEE; KERN Jan F.; MESSINGER, Johannes; WHITMARSH, John. Photosystem II. **Encyclopedia of life sciences (ELS)**. Wiley, Chichester. doi, v. 10, n. 9780470015902, p. a0000669, 2010.

GRAIPEL, Maurício Eduardo et al. Características associadas ao risco de extinção nos mamíferos terrestres da mata atlântica. **Oecologia Australis**, v. 20, n. 1, 2016.

GUERRA, Miguel Pedro; VESCO, Lirio Luiz Dal. Strategies for the micropropagation of bromeliads. **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants**, p. 47-66, 2010.

HELLER, Sascha et al. Elucidating phylogenetic relationships in the *Aechmea* alliance: AFLP analysis of *Portea* and the *Gravisia* complex (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Systematic Botany**, v. 40, n. 3, p. 716-725, 2015.

HUANG, Ping-Lung et al. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 105, n. 1, p. 73-78, 2011.

IBRAFLOR – **Instituto Brasileiro de Floricultura**. Acesso em 26 de agosto de 2016. Disponível em http://www.ibraflor.com/ns_exportacao.php/

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal. **Culturas temporárias e permanentes**. Volume 40 2013. Av. Franklin Roosevelt, 166, Rio de Janeiro: ISSN 0131 – 3963, 2014.

INSTRUÇÃO NORMATIVA, N. 6, de 23 de setembro de 2008. **Lista Oficial de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção**, 2008.

JEONG, Byoung Ryong; FUJIWARA, Kazuhiro; KOZAI, Toyoki. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. **Horticultural Reviews**, Volume 17, p. 125-172, 1995.

JOHANSEN, Donald Alexander. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p, 1940.

KALAJI, Hazem M. et al. Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 4, p. 1-11, 2016.

KALAJI, Hazem M. et al. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis Research**, v. 122, n. 2, p. 121-158, 2014.

KANASHIRO, Shoey et al. Effects of nitrogen concentrations on the growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Sm. cultured *in vitro*. **Hoehnea**, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

KANASHIRO, Shoey. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Smith *in vitro***. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

KIM, Young C. Studies on the physiology of development in crops. **The Research Bulletin of Korean Agricultural Society (Korea Republic)**, 1956.

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, Toyoki. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of Eucalyptus plantlets *in vitro* and *ex vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 31, n. 3, p. 144-149, 1995.

KNUDSON, Lewis. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

KOPEČNÝ, David et al. Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. **The FEBS journal**, v. 283, n. 2, p. 361-377, 2016.

KOZAI, Toyoki. Controlled Environments in Conventional and Automated. **Scale-Up and Automation in Plant Propagation: Cell Culture and somatic cell Genetics of Plants**, v. 8, p. 213, 2012.

KOZAI, Toyoki; KUBOTA, Chieri; JEONG, Byoung Ryoung. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

KRISHNAN, Remya; MURUGAN, K. Axenic culture of bryophytes: A case study of liverwort *Marchantia linearis* Lehm. & Lindenb. **Indian Journal Biotechnology**, v. 13, p. 131-135, 2014.

KURITA, Flávia Maria Kazue et al. Fenologia, cultivo *in vitro* e aclimatização da bromélia ameaçada de extinção *Nidularium minutum* Mez. **Biotemas**, v. 27, n. 1, p. 59-69, 2013.

LAI, Mao-chuan; SUN, Ying-bo. *Vitro* rapid propagation of *Guzmania* cv. focus. **Guangdong Agricultural Sciences**, v. 14, p. 017, 2013.

LANG, Gerald E.; REINERS, William A.; HEIER, Ronald K. Potential alteration of precipitation chemistry by epiphytic lichens. **Oecologia**, v. 25, n. 3, p. 229-241, 1976.

LEPSCH, Igo F. **Formação e conservação dos solos**. Oficina de textos, 2016.

LETHAM, David Stuart. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. **Life Sciences**, v. 2, n. 8, p. 569-573, 1963.

MACIEL, Amanda Rodrigues et al. Amaciantes Cárneos: tipos e aplicação em carne bovina. **DESAFIOS: Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 2, n. 1, p. 160-174, 2016.

MACKOVÁ, Hana et al. Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 10, p. 2805-2815, 2013.

MAGALHAES, Paulo César et al. Respostas anatômicas, fisiológicas e enzimáticas em linhagens de sorgo contrastantes a seca sob estresse hídrico. **Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2016.

MALES, Jamie; GRIFFITHS, Howard. Leaf economic and hydraulic divergences underpin ecological differentiation in the Bromeliaceae. **Plant, Cell & Environment**, 2017.

MANETTI, Liliana Maria; DELAPORTE, Rosemeres Horwat; LAVERDE, J. R. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885-1897, 2009.

MANGIERI, Mariano A. et al. Cytokinins: A key player in determining differences in patterns of canopy senescence in Stay-Green and Fast Dry-Down sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids. **European Journal of Agronomy**, v. 86, p. 60-70, 2017.

MAPES, Marion O. Tissue culture of bromeliads. In: **Combined Proceedings of International Plant Propagators Society**. 1973.

MARTINELLI, Gustavo et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, p. 209-258, 2008.

MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. CNCFlora, Centro Nacional de Conservação da Flora, 2013.

MARTINS, João Paulo Rodrigues et al. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 126, n. 1, p. 43-57, 2016a.

MARTINS, João Paulo Rodrigues et al. Chlorophyll *a* fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 4, p. 471-481, 2015b.

MARTINS, João Paulo Rodrigues et al. Direct organogenesis and leaf-anatomy modifications *in vitro* of *Neoregelia concentrica* (Vellozo) LB Smith (Bromeliaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, p. 2179-2187, 2014.

MARTINS, João Paulo Rodrigues et al. Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 2, p. 138-146, 2013.

MARTINS, João Paulo Rodrigues et al. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, n. 1, p. 121-132, 2015a.

MARTINS, João Paulo Rodrigues et al. Physiological responses by *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) when grown under controlled microenvironmental conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1952-1961, 2016b.

MATHUR, S.; KALAJI, H. M.; JAJOO, A. Investigation of deleterious effects of chromium phytotoxicity and photosynthesis in wheat plant. **Photosynthetica**, v. 54, n. 2, p. 185-192, 2016.

MAYER, Juliana Lischka Sampaio et al. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort.(Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008.

MEDEIROS, Natália da Conceição; SANGALLI, Andréia. Diversidade Vegetal do Cerrado e Possibilidades de Usos na Agroecologia. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2015.
SILVA, Adriano Bortolotti da et al. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciencia**, v. 33, n. 11, p. 839-843, 2008.

MEKERS, O. *In vitro* propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). In: **Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes 78**. 1977. p. 311-320.

MENG, L.-L. et al. Effects of drought stress on fluorescence characteristics of photosystem II in leaves of *Plectranthus scutellarioides*. **Photosynthetica**, v. 54, n. 3, p. 414-421, 2016.

MENGARDA, Liana Hilda Golin et al. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 6, p. 469-474, 2009.

MERCIER, Helenice; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* - an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News (United Kingdom)**, 1993.

MERCIER, Helenice; KERBAUY, Gilberto B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of the Bromeliad Society (USA)**, 1994.

MERCIER, Helenice; KERBAUY, Gilberto B. *In vitro* multiplication of *Vriesea forsteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, n. 3, p. 247-249, 1992.

MERCIER, Helenice; KERBAUY, Gilberto B. Micropropagation of Ornamental Bromeliads (Bromeliaceae). In: **High-Tech and Micropropagation VI**. Springer Berlin Heidelberg, 1997. p. 43-57.

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

MERCIER, Helenice; NIEVOLA, Catarina C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, v. 1, n. 1, p. 57-62, 2003.

MISHRA, Supriya et al. A review on pineapple leaf fibers, sisal fibers and their biocomposites. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 289, n. 11, p. 955-974, 2004.

MITTERMEIER, Russell A. et al. **Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC, 1999.

MOGOLLÓN, N.; DÍAZ, J.; HERNÁNDEZ, N. Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L." Queen Australia". **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 21, n. 4, 2004.

MOLLO, Luciana et al. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 1, p. 141-149, 2011.

MONTEIRO, Raquel Fernandes; FORZZA, Rafaela Campostrini. A família Bromeliaceae no parque estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 7-33, 2008.

MORELLATO, L. Patrícia C.; HADDAD, Célio F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest1. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 786-792, 2000.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURCHIE, Erik H.; LAWSON, Tracy. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, p. ert208, 2013.

MYERS, Norman et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NEGRELLE, Raquel Rejane Bonato; ANACLETO, Adilson; MITCHELL, Darcy. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization-doi:

10.4025/actascibiolsci. v34i1. 7314. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 1, p. 91-100, 2012.

NEGRELLE, Raquel Rejane Bonato; MITCHELL, Darcy; ANACLETO, Adilson. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 1, 2012.

NIEVOLA, Catarina Carvalho et al. Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 6, p. 832-837, 2005.

NISLER, Jaroslav et al. Novel thidiazuron-derived inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase. **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 1-2, p. 235-248, 2016.

ODUM, Eugene P. **Fundamentos de ecologia**. Cengage Learning Editores. México. xvi, p. 598, 5a ed., 2006.

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de et al. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 25-30, 2007.

OLIVEIRA, Rogério Ribeiro de. The importance of epiphytic bromeliads on the turnover of nutrients at the Atlantic Rain Forest. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, p. 793-799, 2004.

OUKARROUM, Abdallah; SCHANSKER, Gert; STRASSER, Reto J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 2, p. 188-199, 2009.

PARDO, Adriana et al. Regeneración *in Vitro* de *Billbergia Rosea* Hortus Ex Beer a Partir de Ápices Caulinares. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas**, v. 42, n. 4, 2008.

PAULA, C. C. **Florística da família Bromeliaceae no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais, Brasil**. 1998. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 238p.

PEIXOTO, Décio Medeiros et al. Uso do mel de abelha associado ao *Ananas comosus* (Bromelin) no tratamento da tosse irritativa aguda. **Revista Paulista de Pediatria**, 2016.

PEREIRA, Antonio Carlos; SANTOS, Eduardo Ribeiro dos. Frutas nativas do Tocantins com potencial de aproveitamento econômico. **AGRI-ENVIRONMENTAL SCIENCES**, v. 1, n. 1, 2016.

PEREIRA, Tiago Augusto Rodrigues et al. Leaf morpho-anatomical variations in *Billbergia elegans* and *Neoregelia mucugensis* (Bromeliaceae) exposed to low and high solar radiation. **Botany**, v. 91, n. 6, p. 327-334, 2013.

PICKENS, Kimberly A. et al. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 4, p. 348-353, 2006.

PILATTI, Fernanda Kokowicz et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 82-98, 2011.

PING, Xiu-min et al. Establishment and Optimization of Regeneration System of Ornamental Bromeliads. **Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)**, v. 3, p. 018, 2010.

PINTO, Luiz Paulo et al. Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. **Biologia da conservação: essências. São Carlos: RiMa**, p. 91-118, 2006.

POMPELLI, Marcelo Francisco et al. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 117-126, 2005.

POMPELLI, Marcelo Francisco; FERNANDES, Denise; GUERRA, Miguel Pedro. Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae)—an endangered bromeliad from South Brazil. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, n. 4, p. 192-198, 2005.

PORCAR-CASTELL, Albert et al. Linking chlorophyll *a* fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: mechanisms and challenges. **Journal of Experimental Botany**, p. eru191, 2014.

POSPÓŠILOVÁ, Jana. et al. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, n. 4, p. 481-497, 1999.

PUGLIA, Debora; BIAGIOTTI, Jerico; KENNY, Jose M. A review on natural fibre-based composites—Part II: Application of natural reinforcements in composite materials for automotive industry. **Journal of Natural Fibers**, v. 1, n. 3, p. 23-65, 2005.

QUIROZ, Karla A. et al. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 20, 2017.

RECH FILHO, Arlindo et al. 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 & Conservation**, v. 14, n. 8, p. 1799-1808, 2005.

RECH FILHO, Arlindo; VESCO, Lírio Luiz Dal; GUERRA, Miguel Pedro. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic forest. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 909-912, 2009.

RESENDE, Cristiano de et al. *In vitro* culture of *Vriesea cacuminis* LB Sm.(Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 71, n. 1, p. 55-61, 2016.

RESENDE, Cristiano F. et al. Proline levels, oxidative metabolism and photosynthetic pigments during *in vitro* growth and acclimatization of *Pitcairnia encholirioides* LB Sm. (Bromeliaceae). **Brazilian Journal of Biology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2016.

ROCHA, Carlos Frederico Duarte da et al. Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. **Vidália**, v. 2, n. 1, p. 52-68, 2004.

ROLLI, Eleonora et al. *In vitro* micropropagation of the aquatic fern *Marsilea quadrifolia* L. and genetic stability assessment by RAPD markers. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 149, n. 1, p. 7-14, 2015.

ROSUMÉK, Félix Baumgarten et al. Formigas de solo e de bromélias em uma área de Mata Atlântica, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil: Levantamento de espécies e novos registros. **Biotemas**, v. 21, n. 4, p. 81-89, 2008.

SALLA, Francesca; JOSÉ, Anderson Cleiton; FARIA, José Márcio Rocha. Análise ecofisiológica de *Genipa americana* L. em banco de sementes induzido. **Cerne**, v. 22, n. 1, p. 93-100, 2016.

SALOMÃO, Karina. **Aspectos reprodutivos e micropropagação em *Dyckia distachya* Hassler, espécie ameaçada de extinção**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SANJAY, M. R. et al. Applications of Natural Fibers and Its Composites: An Overview. **Natural Resources**, v. 7, n. 03, p. 108, 2016.

SANTANA, José Raniere Ferreira de et al. Anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, 2008.

SANTA-ROSA, Sandra et al. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2013.

SANTIAGO, Gisele; REINIGER, Lia Rejane Silveira; HANAUER, Joana Graciela. Potato somaclones identified by minimum descriptors sprout. **Ciência Rural**, v. 45, n. 8, p. 1381-1386, 2015.

SANTOS, Daniela Soares dos. **Influência da temperatura, ácido giberélico e cálcio no desenvolvimento de segmentos nodais *in vitro* da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto**. 2014. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica.

SANTOS, Daniela Soares dos. **Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno**. 2009. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica.

SANTOS, Izulmé Rita Imaculada et al. Situación actual y perspectivas de la investigación en crioconservación de recursos fitogenéticos en Brasil. **en América Latina y el Caribe**, p. 75, 2013.

SANTOS, Priscila Bezerra dos et al. Número de explantes, meio de cultura e fotoperíodo na micropropagação de abacaxizeiro ornamental. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 4, p. 749-754, 2015.

SCHUTTZ, Rosangela; ARAÚJO, Luiz C.; SÁ, F. Bromélias: abrigos terrestres de vida de água doce na floresta tropical. **Natureza**, v. 10, p. 89-92, 2012.

SILVA, Adriano Bortolotti da et al. Luz natural, sacarose e fitorreguladores na anatomia foliar e crescimento *in vitro* de abacaxizeiro micropropagado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 8, n. 1-2, p. 1-9, 2016.

SILVA, André Luis Lopes da et al. *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). **Iheringia. Série Botânica**, v. 64, n. 2, p. 151-156, 2009.

SILVA, Daniel Paes; GOMES, Iana de Almeida Maravilha; CRUZ, Marco Antonio Lopes. Vegetação de restinga: aspectos do impacto provocado pelo desenvolvimento sócio-econômico da região norte-fluminense e alternativas para sua valorização. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 23, 2015.

SILVEIRA, Daniela Garcia et al. 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.

SIMÃO, Mariela Justiniano et al. Induction of *in vitro* shoots of *Billbergia euphemiae* E. Morren (Bromeliaceae) from leaf explants. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 207, 2016.

SKOOG, Folke; MILLER, Carlos O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SMITH, Lyman B.; DOWNS, Roland. J. Flora neotrópica. **Pitcarnioideae (Bromeliaceae)**, v. 14, n. 1, p. 1-609, 1974.

SONOIKE, Kintake. Photoinhibition of photosystem I. **Physiologia plantarum**, v. 142, n. 1, p. 56-64, 2011.

SOUZA, Thaysi Ventura et al. Morpho-and histodifferentiation of shoot regeneration of *Billbergia zebrina* (Helbert) Lindley nodular cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 127, n. 2, p. 393-403, 2016.

SOUZA, Wenia de O. et al. Checklist of Angiosperms from Parque Estadual de Itaúnas, Espírito Santo, Brazil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 3, p. 571-581, 2016.

STEVENS, Peter F. Angiosperm phylogeny website. Version 13 [last update 05/02/2017]. 2017.

STRASSER, Bruno J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transient. **Photosynthesis Research**, v. 52, n. 2, p. 147-155, 1997.

STRASSER, Bruno J.; STRASSER, Reto Jörg. **Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test**. 1995.

STRASSER, Reto J.; TSIMILLI-MICHAEL, Merope; SRIVASTAVA, Alaka. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. **Chlorophyll *a* Fluorescence**, p. 321-362, 2004.

STRASSER, Reto Jörg et al. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. **Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation**, p. 445-483, 2000.

TAKEUI, Bruna et al. *In vitro* culture of *heliconia* in different light sources. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 2, p. 39, 2017.

TALLA, Sai Krishna et al. Cytokinin delays dark-induced senescence in rice by maintaining the chlorophyll cycle and photosynthetic complexes. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 6, p. 1839-1851, 2016.

TAMAKI, Vívian et al. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. **O Mundo da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 91-97, 2011.

TAMAKI, Vívian; MERCIER, Helenice. Effects of different ammoniacal nitrogen sources on N-metabolism of the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana* Mez. **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, n. 4, p. 407-413, 2001.

TANG, Guiliang et al. Girdling-induced *Alhagi sparsifolia* senescence and chlorophyll fluorescence changes. **Photosynthetica**, v. 53, n. 4, p. 585-596, 2015.

TAVARES, Armando R. et al. Structural analysis of the foliar epidermis during acclimatization of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) *in vitro* cultured. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 45-50, 2015.

THAKUR, Vijay Kumar; THAKUR, Manju Kumari. Processing and characterization of natural cellulose fibers/thermoset polymer composites. **Carbohydrate polymers**, v. 109, p. 102-117, 2014.

TOMBOLATO, Antônio Fernando Caetano et al. Cultura *in vitro* da bromélia. **O agrônômico**, v. 43, p. 77-78, 1991.

TORRES, Cláudia; SILVA, Daniela; FERREIRA, Tânia. POLUIÇÃO E CLIMA–EFEITO DE ESTUFA. In: **I Congresso VIVER AMBIENTE**, 2008.

VASIL, Indra (Ed.). **Scale-Up and Automation in Plant Propagation: Cell Culture and somatic cell Genetics of Plants**. Academic Press, 2012.

VESCO, Lirio Luiz Dal et al. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia horticulturae**, v. 128, n. 4, p. 515-522, 2011.

VIEHMANNNOVA, Iva et al. Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through adventitious shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 125, n. 2, p. 293-302, 2016.

VINTERHALTER, Branka; VINTERHALTER, D. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. **Scientia Horticulturae**, v. 57, n. 3, p. 253-263, 1994.

VOGES, Joana Gerent et al. Protocorm development of *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae) in response to different saline formulations and culture conditions. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 287-292, 2014.

WALDEMAR, Celso Copstein; IRGANG, Bruno Edgar. A ocorrência do mutualismo facultativo entre *Dickia maritima* Backer (Bromeliaceae) e o cupim *Cortaritermes silvestrii* (Holgren), Nasutitermitinae, em afloramentos rochosos no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 1, p. 37-48, 2003.

WANG, Yanwen W. et al. Chlorophyll *a* fluorescence analysis of high-yield rice (*Oryza sativa* L.) LYPJ during leaf senescence. **Photosynthetica**, v. 54, n. 3, p. 422-429, 2016.

WATSON, James E. M. et al. The performance and potential of protected areas. **Nature**, v. 515, n. 7525, p. 67-73, 2014.

WU, Xuexia et al. Effects of cytokinin on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters and antioxidative system in seedlings of eggplant (*Solanum melongena* L.) under salinity stress. **Acta physiologiae plantarum**, v. 34, n. 6, p. 2105-2114, 2012.

YASEEN, Mehwish et al. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.

YUSUF, Mohd Aslam et al. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1797, n. 8, p. 1428-1438, 2010.

ZAMBERLAN, Priscilla Mena; RICHTER, Silvia Nair Cordeiro; BODANESE-ZANETTINI, Maria Helena. O efeito do Paclobutrazol na multiplicação de duas espécies do gênero *Vriesea* (Bromeliaceae) nativas do Rio Grande do Sul. **Salão de Iniciação Científica (16.: 2004: Porto Alegre). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2004.**, 2004.

ZAMPIERI, Maria Cristina Tessari et al. Accumulation of mineral nutrients in *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Smith (Bromeliaceae) contaminated with zinc during *in vitro* culture. **Hoehnea**, v. 39, n. 3, p. 379-385, 2012.

ZAVALETA-MANCERA, Hilda Araceli et al. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 12, p. 1572-1582, 2007.

ZHANG, Litao et al. Changes of photosynthetic behaviors and photoprotection during cell transformation and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* grown outdoors in tubular photobioreactors. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 33, 2016.

ZHAO, Yu et al. The interaction between rice ERF3 and WOX11 promotes crown root development by regulating gene expression involved in cytokinin signaling. **The Plant Cell**, v. 27, n. 9, p. 2469-2483, 2015.

ZIMMER, Kirstin; PIEPER, Walter. Methods and problems of clonal propagation of bromeliads *in vitro*. In: **Symposium on Production of Potted Plants and Cut Flowers 64**. 1976. p. 25-30.

ZORNIG, R. K. Micropropagação de bromélias. **Bromelia**, v. 3, p. 3-9, 1996.