

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

**ROSIANE CIPRIANO**

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO E DO SILÍCIO  
NA FISIOLOGIA E ANATOMIA DE *Bromelia antiacantha*  
(Bromeliaceae)**

**São Mateus, ES  
Agosto de 2016**

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

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO E DO SILÍCIO  
NA FISIOLOGIA E ANATOMIA DE *Bromelia antiacantha*  
(Bromeliaceae)**

**ROSIANE CIPRIANO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do Espírito  
Santo, como parte das exigências  
do Programa de Pós-Graduação  
em Biodiversidade Tropical, para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biodiversidade Tropical.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto**

**São Mateus, ES  
Agosto de 2016**

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO E DO SILÍCIO  
NA FISIOLOGIA E ANATOMIA DE *Bromelia antiacantha*  
(Bromeliaceae)**

**ROSIANE CIPRIANO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do Espírito  
Santo, como parte das exigências  
do Programa de Pós- Graduação  
em Biodiversidade Tropical, para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biodiversidade Tropical.

Aprovada em 18 de agosto de 2016.

---

**Prof. Dr. Elias Terra Werner**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
CCA/UFES  
(Membro Externo)

---

**Dr. João Paulo Rodrigues Martins**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
CEUNES/UFES  
(Membro interno)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Barcelos P. Lima Gontijo**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientadora)

**Aos meus pais Jorge Cipriano e Marlene da  
Costa Silva Cipriano e aos meus irmãos  
Francisco de Assis Cipriano e Marluvia da  
Penha Cipriano.  
Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e por me dar forças para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais e irmãos por todo o amor, apoio, força e orações para que eu nunca desanimasse e persistisse com os meus objetivos.

Aos meus avós (Santina e Pedro, Amélia (*in memoriam*)) e aos demais familiares pelas orações, apoio e força.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Ivani, Karol, Bianca, Geferson e Carla. Aos meus amigos do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical. Aos amigos da Agronomia: Alessandra, Cássio, Douglas, Juliany, Fábio, João, Lucas e outros. Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal. Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração, por todo apoio, ajuda e ensinamentos.

À professora Dra. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo e ao professor Dr. Antelmo Ralph Falqueto pela orientação e co-orientação, por toda dedicação e atenção dada ao meu trabalho, pelos ensinamentos, confiança depositada em mim, pelas correções na escrita da dissertação e pela amizade.

Ao Dr. João Paulo Rodrigues Martins pela ajuda na estatística, na anatomia, na interpretação dos resultados, pela participação da banca avaliadora e pela amizade.

Ao professor Dr. Elias Terra Werner, por fazer parte da banca avaliadora.

As minhas amigas de república Roberta, Maísa, Marcelli e Aiwny, pela amizade, companheirismo, momentos de descontração, pelas risadas e ajuda.

Aos amigos que fiz em São Mateus, aos amigos da graduação UFES/Vitória e aos velhos amigos, obrigada pela amizade.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em especial ao Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade tropical pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Meus sinceros agradecimentos!

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>12</b>
Referências Bibliográficas .....	14
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>16</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>1. Família Bromeliaceae e sua importância</b> .....	<b>16</b>
<b>2. Cultivo <i>in vitro</i></b> .....	<b>19</b>
<b>3. Condições de cultivo</b> .....	<b>20</b>
<b>4. Silício</b> .....	<b>21</b>
<b>5. Fluorescência da clorofila <i>a</i></b> .....	<b>23</b>
<b>6. Anatomia</b> .....	<b>25</b>
Referências Bibliográficas .....	27
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>37</b>
<b>Efeito de diferentes meios de cultivo na germinação, crescimento e fisiologia <i>in vitro</i> de <i>Bromelia antiacantha</i> (Bromeliaceae)</b> .....	<b>37</b>
RESUMO .....	37
ABSTRACT.....	39
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
2.1 Material vegetal .....	43
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> .....	43
2.2.1 Germinação.....	43
2.2.2 Análise de parâmetros de crescimento .....	44
2.2.3 Análises fisiológicas .....	45
2.2.4 Análise estatística .....	45
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
3.1 Germinação e crescimento <i>in vitro</i> .....	46
3.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	47
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
4.1 Germinação e crescimento <i>in vitro</i> .....	53
4.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	56
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>

Referências Bibliográficas .....	62
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>71</b>
<b>Influência do silício na fisiologia e anatomia de <i>Bromelia antiacantha</i> (Bromeliaceae) em condições <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....</b>	<b>71</b>
RESUMO .....	71
ABSTRACT .....	73
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>78</b>
2.1 Material vegetal .....	78
2.2 Cultivo <i>In vitro</i> .....	78
2.3 Cultivo <i>Ex vitro</i> .....	79
2.4 Análises .....	79
2.4.1 Análise de parâmetros de crescimento <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....	79
2.4.2 Análises fisiológicas <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....	80
2.4.3 Análise anatômica <i>ex vitro</i> .....	80
2.5 Análise estatística .....	81
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>82</b>
3.1 Parâmetros de crescimento <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....	82
3.2 Fluorescência da clorofila <i>a in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....	83
3.3 Anatomia <i>ex vitro</i> .....	86
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>90</b>
4.1 Crescimento <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....	90
4.2 Fluorescência da clorofila <i>a in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....	92
4.3 Anatomia <i>ex vitro</i> .....	95
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>98</b>

## RESUMO

CIPRIANO, ROSIANE; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Agosto de 2016; **Influência do meio de cultivo e do silício na fisiologia e anatomia de *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae)**. Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo, Co-orientador: Antelmo Ralph Falqueto.

A Cultura de Tecidos Vegetais pode contribuir na multiplicação de diversas espécies de interesse comercial, e tem ganhado espaço na preservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção, como as bromeliáceas. Para a realização dessas técnicas são utilizados meios nutritivos que fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* das plantas. Contudo, as condições de cultivo podem levar à formação de plantas com estruturas e tecidos pouco desenvolvidos, anatômica ou fisiologicamente, que podem prejudicar o posterior estabelecimento *ex vitro*. Com o objetivo de encontrar uma melhor concentração do meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sobre e a influência do silício no cultivo *in vitro* e *ex vitro* de *B. antiacantha*, realizou-se dois trabalhos. O primeiro (Capítulo II) teve como objetivo definir um meio de cultivo para o estabelecimento *in vitro* de *B. antiacantha* testando diferentes concentrações do meio MS completo (0, 25%, 50%, 75% e 100%) sobre a germinação das sementes e crescimento *in vitro* desta bromeliácea, bem como a eficiência fotossintética das plantas estabelecidas nestas condições. O segundo (Capítulo III) teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de silicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) (0; 2,5; 5,0; 10 e 15  $\text{mg L}^{-1}$ ) crescimento e fisiologia *in vitro* e *ex vitro* e na anatomia *ex vitro* de *B. antiacantha*. No primeiro trabalho o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) consistindo de 13 repetições por tratamento (cada repetição continha quatro sementes por frasco). A germinação foi avaliada diariamente para a determinação do índice de velocidade de germinação (IVG), do tempo médio de germinação (TMG) e, ao final de 90 dias foram avaliados a porcentagem de germinação (G%), o número de folhas (NF) e de raízes (NR), o comprimento aéreo (CA) e radicular (CR), a área foliar (AF), a massa fresca da plântula (MFP) e também as medidas da fluorescência da clorofila *a*. No segundo experimento o delineamento experimental em DIC consistindo de 5 repetições por tratamento (cada repetição continha 5 tubos, com uma planta por tubo). Transcorridos 45 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados os parâmetros de crescimento (NF, NR, CA, CR, AF e MFP) e também as medidas de fluorescência da clorofila *a*. Após 28 dias de cultivo *ex vitro* foram avaliados os mesmos parâmetros de crescimento e retiradas amostras foliares para avaliar as espessuras das epidermes adaxial e abaxial, do clorênquima, do hidrênquima e estimar o



número de estômatos. As medições de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de aclimatização. Os dados foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Verifica-se que para a espécie *B. antiacantha*, o meio MS 25% promoveu os melhores resultados quanto à germinação, ao crescimento e ao desenvolvimento do aparato fotossintético das plântulas. A utilização do  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  influenciou apenas os parâmetros AF durante o cultivo *in vitro* e CA durante o cultivo *ex vitro*. Em relação ao aparato fotossintético, os parâmetros JIP mostraram efeito de fotoinibição aos 7 e 14 dias, e nas concentrações de 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . Assim, pode-se inferir que o  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  não atuou melhorando o funcionamento do aparato fotossintético, visto que as demais concentrações do silicato (2,5 e 15  $\text{mg L}^{-1}$ ) não diferiram significativamente de 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$ . *B. antiacantha* apresentam estômatos tetracíticos com distribuição hipostomática, apresentaram uma camada de células epidérmicas em ambos os lados da folha, parênquima de armazenamento de água (hidrênquima) com células de paredes finas na parte lateral da face adaxial, parênquima clorofiliano (clorênquima) com células isodiamétricas, feixes vasculares colaterais, geralmente feixes maiores alternados com os menores. O mesofilo tem uma organização dorsiventral. Quanto a anatomia foliar as concentrações de 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  e 15  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  promoveram efeitos benéficos na plântula por meio do aumento da densidade estomática e da espessura da epiderme adaxial, respectivamente.

Palavras chave: Bromélias; cultivo *in vitro*; meio simplificado; fluorescência da clorofila *a*; anatomia vegetal; silicato de sódio

## ABSTRACT

CIPRIANO, ROSIANE; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; August 2016; **Influence of culture medium and silicon in the physiology and anatomy of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae)**. Advisor: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo, Co-advisor: Antelmo Ralph Falqueto.

The Plant Tissue Culture may contribute to the proliferation of various species of commercial interest, and has gained ground in the preservation of rare or endangered species, such as bromeliads. To perform these techniques, nutrient medium, that provide substances essential for growth and development *in vitro* of plants are utilized. However, the growing conditions can lead to the formation of plants with structures and tissues undeveloped, anatomically or physiologically, which may affect subsequent establishment *ex vitro*. In order to find a better concentration of MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) over and influence of silicon *in vitro* and *ex vitro* culture of *B. antiacantha* it was held two jobs. The first (Chapter II) aimed to define a culture medium for the *in vitro* establishment of *B. antiacantha* testing different concentrations of complete MS medium (0, 25%, 50%, 75% and 100%) on seed germination and *in vitro* growth of this bromeliads and the photosynthetic efficiency of plants established under these conditions. The second (Chapter III) aimed to evaluate the effect of different sodium silicate concentrations ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) (0, 2,5, 5,0, 10 and 15  $\text{mg L}^{-1}$ ) growth and physiology *in vitro* and *ex vitro* and anatomy *ex vitro* of *B. antiacantha*. In the first study the experimental design was completely randomized (DIC) consisting of 13 replicates per treatment (each replicate contained four seeds per bottle). Germination was evaluated daily to determine the germination speed index (GSI), the average germination time (GMT) and at the end of 90 days were evaluated germination percentage (G%), the number of leaves (NF) and roots (NR), the air length (CA) and root (CR), leaf area (AF), the fresh weight of seedling (MFP) and also the measurements of chlorophyll *a* fluorescence. In the second experiment the experiment in DIC consisting of 5 replicates per treatment (each repetition contained 5 tubes, with one plant per tube). Elapsed 45 days *in vitro* cultivation were evaluated growth parameters (NC, NR, CA, CR, AF and MFP) and also the fluorescence measurements of chlorophyll. After 28 days of cultivation *ex vitro* were evaluated the same growth parameters and taken leaf samples to evaluate the thickness of adaxial and abaxial epidermis, the chlorenchyma, the hydrenchyma and estimate the number of stomata. Fluorescence measurements of chlorophyll were carried out at 7, 14, 21 and 28 days of acclimatization. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by

Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). It appears that for the species *B. antiacantha*, medium MS 25% promoted the best results for germination, growth and development of the photosynthetic apparatus of plants. The use of  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  only influenced parameters AF during *in vitro* cultivation and CA during the *ex vitro* cultivation. In relation to the photosynthetic apparatus, the JIP parameters showed photoinhibition effect at 7 and 14 days and at the concentrations of 5 and 10  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . Thus, it can be inferred that  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  not acted improving the functioning of the photosynthetic apparatus, since other silicate concentrations (2,5 and 15  $\text{mg L}^{-1}$ ) did not differ significantly between 5 and 10  $\text{mg L}^{-1}$ . *B. antiacantha* present tetracytic stomata with hypostomatic distribution, had a layer of epidermal cells on both sides of the sheet, water storage parenchyma (hydrenchyma) with thin cell walls on the side of the adaxial surface, chlorophyll parenchyma (chlrenchyma) cells with isodiametrical, collateral vascular bundles, usually larger beams alternated with the minor. The mesophyll has a dorsiventral organization. The leaf anatomy of the concentration of 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  and 15  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  promoted beneficial effects on seedling through the increased stomatal density and thickness of adaxial epidermal respectively.

Keywords: Bromeliads; *in vitro* culture; through simplified; chlorophyll *a* fluorescence; plant anatomy; sodium silicate

## INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é um bioma caracterizado por uma alta diversidade de espécies vegetais. Estima-se que a vegetação primária restante dessa floresta representa apenas 7,5% da extensão original (HEYWOOD, 1995; MYERS, et al. 2000). O processo de devastação progressiva neste bioma e seus ecossistemas associados causou uma ampla redução da sua biodiversidade, incluindo a perda da rica flora de Bromeliaceae (COFFANI NUNES, 2002).

A utilização das técnicas de cultura de tecidos vegetais permite a manutenção da diversidade genética observada nas populações naturais, auxiliando na conservação de várias espécies vegetais ameaçadas de extinção, como as de bromélias (MERCIER; KERBAUY, 1997; POMPELLI; GUERRA, 2005; RECH FILHO et al., 2005). A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas, nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas com meio nutritivo artificial (PASQUAL, 2001). É uma técnica vantajosa já que possibilita obter várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano e da área necessária à propagação da espécie; a emergência da planta ocorre em um tempo mais reduzido, quando comparado ao processo natural, além de um número muito maior de sementes germinarem (MERCIER; KERBAUY, 1997; ERIG; SCHUCH, 2005).

O sucesso do estabelecimento de células, órgãos ou tecidos *in vitro* depende, em geral, da seleção do explante, das condições de temperatura e luminosidade em que a cultura é mantida e do uso de um meio de cultivo apropriado (PASQUAL; HOFFMANN; RAMOS, 1997), já que *in vitro* as plantas apresentam exigências nutricionais específicas, sendo os meios modificados de acordo com as suas necessidades (TORRES et al., 2001).

Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o silício ainda não tem sido muito estudado na micropropagação. Contudo, do ponto de vista fisiológico, esse elemento tem demonstrado efeito benéfico sobre o aumento de produção de diversas culturas, promovendo maior eficiência fotossintética (GOMES et al., 2008).

A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos, como aumento da capacidade fotossintética, aumento no teor de clorofila total, redução da transpiração, maior crescimento de plantas e aumento da resistência mecânica das células (ZHOU, 1995), exercendo assim, importante papel na estruturação das plantas. Sua presença na parede celular pode elevar os conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina, aumentando a rigidez da célula (BARBOSA FILHO et al., 2001), características estas desejáveis, pois aumenta as taxas de sobrevivência durante a fase de aclimatização. Durante a aclimatização, o uso de ferramentas

importantes, como a análise da fluorescência da clorofila *a* pode auxiliar no monitoramento das alterações que ocorrem nas plantas propagadas *in vitro* (SWAIN et al., 2010). Essa técnica permite avaliar o estresse com mais precisão e de maneira não destrutiva, estudando o comportamento do fotossistema II (FSII) devido a sua sensibilidade (SWAIN et al., 2010).

A análise da anatomia foliar de plantas propagadas *in vitro* é de grande importância para estudos comparativos do desenvolvimento de seus tecidos e estruturas adaptativas, como espessura de cutícula e epiderme, disposição de células, dimensão e número de estômatos, entre outros. Esses estudos podem servir de base para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento durante a aclimatização, a qual se caracteriza por uma elevada mortalidade, muitas vezes, inviabilizando a micropropagação de algumas espécies (ABBADE et al., 2009).

Diante do exposto, a presente dissertação tem como título “Influência do meio de cultivo e do silício na fisiologia e anatomia de *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae)” e está organizada em três capítulos. O capítulo 1 corresponde a Revisão de Literatura. O capítulo 2 é intitulado como “Efeito de diferentes meios de cultivo na germinação, crescimento e fisiologia *in vitro* de *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae)”. Esse capítulo teve como objetivo definir um meio de cultivo para o estabelecimento *in vitro* de *B. antiacantha* por meio da avaliação do efeito de diferentes concentrações do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sobre a germinação das sementes e crescimento *in vitro* desta bromeliácea, bem como a eficiência fotossintética das plantas estabelecidas nestas condições.

O capítulo 3 é intitulado como “Influência do silício na fisiologia e anatomia de *B. antiacantha* em condições *in vitro* e *ex vitro*”. Este capítulo teve como objetivo avaliar diferentes concentrações de silicato de sódio no crescimento *in vitro* e *ex vitro* de *B. antiacantha* por meio de parâmetros biométricos *in vitro* (número de folhas e raízes, comprimento aéreo e radicular, massa fresca da planta e área foliar), da eficiência fotossintética (fluorescência da clorofila *a*) *in vitro* e *ex vitro* e características anatômicas da folha (espessura da epiderme adaxial e abaxial, clorênquima e hidrênquima, e número de estômatos) de plantas cultivadas *ex vitro*.

## Referências Bibliográficas

ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M.; CENTOFANTE, A. R.; OLIVEIRA, C. Anatomia foliar de ipê- Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.) – (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences** Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.

BARBOSA FILHO, M. P.; SNYDER, G. H.; FAGERIA, N. K.; DATNOFF, L. E.; SILVA, O. F. Silicato de cálcio como fonte de silício para arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 325-330, 2001.

COFFANI NUNES, J. V. Bromélias. In: Simões L.L. and Lino C.F. (eds), Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais. **SENAC**, São Paulo, Brazil, pp. 119–132. 2002.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C.; SANTOS, C. D.; ANTUNES, C. S. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.37, n.2, p. 185-190, 2008.

HEYWOOD, V. H. Global Biodiversity Assessment. **UNEP/Cambridge University Press**, UK, Cambridge, 1140 pp. 1995.

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

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In – Biotechnology in Agriculture and Forestry, ed. Bajaj Y.P.S. **Springer-Veriag**, Berlin, Germany, 40 p. 43-57, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497, 1962.

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

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras UFLA/FAEPE, 159p., 1997.

PASQUAL, M. **Texto acadêmicos, meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 127 p., 2001.

POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. **Floresta e Ambiente**, v.12, n.2, p.42-49, 2005.

RECH-FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O. LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea*

*reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1799-1808. 2005.

SWAIN, S. S.; TRIPATHY, T.; MOHAPATRA, P. K.; CHAND, P. K. Photosynthetic and transpiration responses of in vitro-regenerated *Solanum nigrum* L. plants to *ex vitro* adaptation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.2, p.134– 141, 2010.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa, **Circular Técnica**, 24. 19p, 2001.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, 1995.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. Família Bromeliaceae e sua importância

O risco de extinção de espécies biológicas torna-se cada vez mais presente e ameaçador. Dentre as espécies ameaçadas de extinção destacam-se as da família Bromeliaceae, principalmente devido à destruição de seus habitats naturais, a Mata Atlântica, Caatinga, Restinga e Manguezal (NUNES; FORZZA, 2000) e à exploração extrativista, que visa suprir a demanda crescente no mercado de plantas ornamentais.

Esses processos predatórios, que geralmente não respeitam dinâmicas naturais de regeneração e sustentabilidade, têm promovido severos danos ambientais incluindo perda de diversidade biológica tanto de bromélias quanto de outras espécies que com elas co-existem (BITTENCOURT et al., 2002).

A família Bromeliaceae é composta por 3.248 espécies e 58 gêneros (LUTHER, 2010). Bromélias são essencialmente distribuídas em torno do continente Americano com uma grande concentração dos gêneros no sul da América, onde ocorrem aproximadamente 73% dos gêneros e 40% das espécies (NUNES, 2002). O Brasil é o país com maior riqueza de bromeliáceas, abrigando aproximadamente 44 gêneros e 1290 espécies, com 70% destas ocorrendo no bioma Mata Atlântica (BITTENCOURT et al., 2002; FORZZA et al., 2013).

No estado do Espírito Santo a família Bromeliaceae merece destaque pela elevada riqueza de espécies e alto grau de endemismo, principalmente na Mata Atlântica (MARTINELLI et al., 2008; FORZZA et al., 2013). Mesmo sendo o quarto menor Estado da região sudeste e ter sofrido uma das mais altas taxas de desflorestamento do país, possui número de espécies de Bromeliaceae superior ao Bioma Amazônia e Cerrado (FORZZA et al., 2013) e que vem aumentando significativamente, sendo que nos últimos anos mais de 30 novas espécies foram descobertas (VERSIEUX; WANDERLEY, 2007, 2010; LEME et al., 2008, 2010a, 2010b; LEME; KOLLMANN, 2011; COSER; VERSIEUX; WENDT, 2013).

Espécies desta família possuem um grande poder adaptativo, visto que o hábito de comportamento pode variar de terrestre a epífita, vegetam em vários tipos de habitat, desde ambientes com sombreamento total, aqueles expostos a pleno sol, sob umidade elevada, à



condições extremamente áridas, do nível do mar até altitudes elevadas, e em clima quente e tropical úmido a frio e subtropical seco (BITTENCOURT et al., 2002).

De acordo com Reitz (1983), a bromeliáceas desenvolve-se, principalmente, nos solos muito úmidos de florestas, na restinga e vegetação secundária, formando sempre densos agrupamentos de forma descontínua, pelos diversos ambientes que ocupa. Segundo Cogliatti-Carvalho et al (2001), as bromeliáceas são encontrada nas áreas de vegetação fechada pós-praia e em mata periodicamente inundada, o que sugere certa tolerância à alta salinidade.

As bromélias desempenham um importante papel ecológico no ecossistema natural. Várias espécies que possuem hábito epifítico apresentam a habilidade para obter nutrientes pela retirada direta da água disposta como um filme na superfície do vegetal. Além disso, são capazes de criar microclima pela formação de tanques com suas folhas, que se torna o habitat para muitos insetos e fonte de água para muitos animais e pássaros. Isso se torna um elemento importante para a ampliação da diversidade deste habitat (OLIVEIRA, 2004). Por esta característica, diversas espécies animais utilizam a água contida no tanque das bromélias para forrageamento, reprodução e refúgio contra predadores (ROCHA et al., 1997).

As espécies terrestres também são muito eficientes em termos de ciclagem de nutrientes, sendo capazes de tolerar habitats pobres, e com um papel importante do seu microclima na dinâmica de nutrientes (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). Além do que, a umidade estabelecida no interior dessas plantas, através da formação de tanques com suas folhas, propicia ainda, um ambiente favorável para a germinação das sementes de outras plantas (CARVALHO, 2002).

Além desse importante papel ecológico no ecossistema, as bromélias também podem atuar como indicadores ambientais. Espécies do gênero *Tillandsia* foram utilizadas como bioindicadores da poluição do ar na cidade de São Paulo (FIGUEIREDO et al., 2001, 2004) e no biomonitoramento atmosférico (AMADO et al., 2002). *Billbergia zebrina* tolera elevadas quantidades de cobre e pode ser utilizada como uma espécie bioindicadora (MARTINS et al., 2016).

Outras espécies de bromélias possuem grande valor econômico, com destaque para o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Murril) que é utilizado na alimentação na forma de sucos, doces e *in natura*. O caroá-verdadeiro (*Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez) é utilizado na fabricação de fibras naturais (RIBEIRO, 2007a).

Inúmeras espécies medicinais e frutíferas de importância extrativista são encontradas na Mata Atlântica. Entre essas espécies está *Bromelia antiacantha* Bertoloni uma Bromeliaceae terrestre, nativa deste bioma, com grande potencial de uso com características

medicinais, alimentícias, ornamentais e industriais - fabricação de fibras para tecidos; além de cordoaria e fabricação de sabão a partir dos frutos (REITZ, 1983; BARROS; SOUZA, 1995; MERCIER; YOSHIDA, 1998; MARQUES et al., 2007), sendo considerada uma espécie com potencial múltiplo de aplicações.

Outra finalidade econômica de muitas espécies é a extração da bromelina, uma protease (BALLS et al., 1941; HEINICKE; GORTNER, 1957; MURACHI; NEURATH, 1960) utilizada pela indústria alimentícia (HEINICKE; GORTNER, 1957; WHITAKER, 1976; DIAZ, 1988; SCHMITT, 1994) e pela medicina (HEINICKE; GORTNER, 1957; WHITAKER, 1976; TAUSSIG et al., 1985). Esse composto é encontrado na *B. antiacantha* o que garante o seu potencial farmacológico (MACCIÓ; VALLES; CANTERA, 2013; KRUMREICH et al., 2015). Segundo Reitz (1983), esta espécie é empregada na medicina popular por apresentar propriedades medicinais como antihelmíntico, antitussígeno e no tratamento de cálculos renais.

Entretanto, atualmente, o uso mais comum das bromélias tem sido na aplicação de bromélias em projetos paisagísticos como espécies ornamentais (SOUZA; WANDERLEY, 2000). As características que explicam o interesse por essas plantas são o exotismo, a beleza e a durabilidade. Suas inflorescências têm despertado interesse na utilização como flor de corte (TERAO et al., 2005). Levando em consideração todo o potencial econômico e ambiental das bromélias, torna-se importante desenvolver estratégias para a utilização e conservação destes recursos.

A conservação de populações de espécies nativas depende de uma política adequada de proteção ambiental, resgate e conservação dos recursos genéticos (RIBEIRO; SILVA, 1996). Embora a conservação *in situ* seja uma das formas mais adequadas para a conservação da diversidade genética, algumas desvantagens muitas vezes são empecilhos para sua aplicação, como o fato de necessitar de grandes áreas protegidas de qualquer distúrbio e catástrofe natural, o que pode demandar muitos recursos financeiros. Assim, a conservação da diversidade genética seria mais segura se estivesse baseada na combinação de alternativas de conservação *in situ* e *ex situ*, nesta última inclui-se a conservação *in vitro* (OUÉDRAOGO, 1997).

## 2. Cultivo *in vitro*

A Cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (PASQUAL, 2001). O princípio básico da Cultura de tecidos está baseado na exploração da Totipotência das células vegetais (PASQUAL; HOFFMANN; RAMOS, 1997), que é a capacidade que possuem as células somáticas de, em condições adequadas, voltarem a dividir-se, sofrendo desdiferenciação, seguida de rediferenciação em outros tipos celulares, regenerando, então, uma planta completa (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1990).

O cultivo *in vitro* de sementes pode ser considerado uma técnica de grande importância na conservação de germoplasma de bromélias ameaçadas de extinção, visto que a emergência da planta ocorre em um tempo mais reduzido, quando comparado ao processo natural, além de um número muito maior de sementes germinarem (MERCIER; KERBAUY, 1997; ERIG; SCHUCH, 2005). O que é ainda mais interessante para as espécies de bromélias visto que as taxas de germinação destas no ambiente natural, em geral, são baixas (MERCIER; KERBAUY, 1995).

Adicionalmente, a plântula obtida pode funcionar como matriz para um posterior processo de clonagem, chamado de micropropagação, produzindo plantas em larga escala devido à alta taxa de multiplicação e auxiliando na redução da atividade extrativista pela oferta de mudas de plantas saudáveis (ERIG; SCHUCH, 2005). Portanto, possibilita obter várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano e da área necessária à propagação da espécie (MERCIER; KERBAUY, 1997; ERIG; SCHUCH, 2005). Além disso, permite a representação de grande variedade de genótipos em espaço reduzido (ENGELMANN, 1991).

Programas de conservação de germoplasma de bromélias *in situ* e *ex situ* empregam diferentes estratégias, incluindo estudos genéticos, ecológicos e gestão do habitat (RECH-FILHO et al., 2005).

Em bromeliáceas, a técnica de cultivo *in vitro* é muito utilizada para fins comerciais e tem ganhado espaço na preservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (CARNEIRO; MANSUR, 2004; GUERRA; VESCO, 2010; MARTINS et al., 2015).

A micropropagação visando à preservação de espécies deve assegurar a manutenção da variabilidade genética. Para tanto, é importante a utilização de plântulas obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes obtidas de diferentes populações (MERCIER; NIEVOLA,

2003). Neste caso, o cultivo *in vitro* a partir de sementes é aconselhado também por gerar um grande número de plantas-matrizes, evitando a retirada de indivíduos da natureza, o que agravaria o grau de ameaça sobre estas espécies. Outra vantagem decorre da maior facilidade na desinfestação de sementes quando comparadas a outros tecidos extraídos de plantas nativas (MERCIER; KERBAUY, 1994).

Assim, o cultivo *in vitro* de bromélias pode trazer vários benefícios, como a redução do extrativismo predatório de espécies nativas, permitindo a conservação destas no seu ambiente natural (KANASHIRO et al., 1999).

### 3. Condições de cultivo

No estabelecimento de plantas *in vitro* três fatores podem afetar o processo: o genótipo, o tipo de explante (semente, folha, raiz, caule, meristema, entre outros) e a condição da cultura (meio de cultivo, luz, temperatura, recipiente). O sucesso da iniciação e da regeneração do cultivo *in vitro* depende da decisão correta na seleção de todos esses fatores. O desenvolvimento de sistemas de estabelecimento *in vitro* deve considerar uma combinação ótima desses fatores para que o processo seja bem sucedido (CALDAS et al., 1998).

O meio de cultivo utilizado é constituído de sais minerais (micro e macronutrientes), uma fonte de carbono, vitaminas e, em alguns casos, reguladores de crescimento, todos sendo necessários para manter a divisão celular e a proliferação dos explantes. A combinação adequada entre esses componentes, associada às demais condições como luz, temperatura e tipo de recipiente utilizado para a cultura são fundamentais para o sucesso das técnicas da Cultura de tecidos vegetais (KERBAUY, 1997).

Estudos abrangendo a germinação de espécies de Bromeliaceae têm obtido altas taxas de germinabilidade utilizando a forma gelificada dos meios de Knudson (KNUDSON, 1946) ou Murashige e Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962). No entanto, a concentração salina destes meios pode influenciar o desenvolvimento inicial de algumas espécies (MERCIER; KERBAUY, 1994; MERCIER; NIEVOLA, 2003).

Em estudos de nutrição de plantas, o cultivo *in vitro* é muito apropriado, pois como as plantas são cultivadas em condições assépticas é possível controlar o fornecimento de nutrientes (MERCIER; NIEVOLA, 2003).

O suplemento de nutrientes no meio de cultivo é essencial nos sistemas *in vitro* (KANASHIRO et al., 2009). Na maioria das vezes esses meios são baseados em formulações

básicas modificadas, baseando-se nas exigências das plantas quanto à composição dos nutrientes minerais (CALDAS et al., 1998; KANASHIRO et al., 2009). Segundo Naves (2001), a importância da escolha de um meio ideal e uma concentração adequada são fundamentais, pois é ele quem supre as necessidades nutricionais para o crescimento da planta *in vitro*. Um balanço entre nitrogênio, fósforo e cálcio é essencial para a morfogênese e para o crescimento das plantas (RAMAGE; WILLIAMS, 2002). O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) tem sido o mais frequentemente usado em cultivo de plantas tropicais de caráter agrônômico, ambiental e ornamental.

#### 4. Silício

O silício (Si) é abundantemente disponível em solos e é extraído por uma ampla gama de plantas. É um nutriente não essencial, já que em condições nutricionais adequadas as plantas podem completar seus ciclos de vida na sua ausência (EPSTEIN, 1999; EPSTEIN, 2009). A importância do Si para a melhor arquitetura da planta, proporcionando proteção contra estresses bióticos e abióticos, tem sido cada vez mais reconhecida (EPSTEIN, 1999; RAVEN, 2003; LIANG et al., 2007).

As investigações sobre o papel do Si tem sido em grande parte restritas a gramíneas tais como arroz, trigo e cevada (YEO et al., 1999; LIANG et al., 2007; GOTTARDI et al., 2012). A maioria das espécies destas culturas são consideradas sensíveis a estresses ambientais e incremento de Si, tem mostrado fornecer resistência a doenças, tolerância ao estresse salino, toxicidade à metais, estresse hídrico, danos da radiação, desequilíbrio de nutrientes, altas temperaturas e congelamento (EPSTEIN, 1999; MA, 2004; TUNA et al., 2008).

Estudos mostram que o Si é um elemento benéfico para o crescimento da planta. Diversas aplicações têm sido relatadas para uma grande variedade de espécies vegetais, como aumento da resistência a pragas, patógenos e à seca, tolerância a metais pesados e melhoria da qualidade das culturas agrícolas e da produtividade (RICHMOND; SUSSMAN, 2003; FAUTEUX et al., 2005; MA; YAMAJI, 2006, 2008; LIANG et al., 2007).

A absorção de Si trás vantagens por proporcionar melhor arquitetura da planta ao tornar as folhas mais eretas, reduzir a transpiração, aumentar os teores de clorofila e, conseqüentemente, melhorar a eficiência fotossintética (DEREN et al., 1994; ZHOU, 1995).

O silício no interior das plantas é considerado como elemento pouco móvel e o seu transporte, da raiz até a parte aérea, ocorre através do xilema e também depende da taxa de transpiração, como para todos os demais nutrientes (KORNDORFER; DATNOFF, 2000).

Os seus efeitos benéficos são geralmente expressos de forma mais clara sob condições de estresse. Uma vez que as plantas estão sempre expostas a várias tensões durante o crescimento, o Si desempenha um papel importante aliviando tensões, resultando em aumento da produtividade. Relata-se que o gel de sílica depositado sobre a superfície do tecido pode desempenhar um papel importante aliviando estresses bióticos e abióticos (MA; MIYAKE e TAKAHASHI, 2001).

O Si pode aliviar o estresse hídrico diminuindo a transpiração. A transpiração das folhas é mediada através dos estômatos e cutícula. Plantas de arroz tem uma cutícula fina e a formação de uma camada dupla de cutícula, por meio da absorção de silício, diminui significativamente a transpiração. A transpiração do arroz diminui com o aumento do teor de Si na parte aérea (MA, 1988; MA, 1990).

Com relação às técnicas de cultivo *in vitro*, modificações na composição do meio relacionadas com a adição de fontes de Si podem ser positivas para as plantas, por elevar o conteúdo de hemicelulose e lignina, aumentando assim a rigidez na parede celular e com isso, aumentando as taxas de sobrevivência de plantas na aclimatização (CAMARGO et al., 2007). Em estudo com morangueiro, Braga et al. (2009) verificaram que a deposição de cera foi observada com a utilização de silicato de sódio ( $\text{NaSiO}_3$ ) evitando com isso a perda de água pela epiderme.

O Si é depositado como uma sílica amorfa hidratada ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ), o que é necessário para o desenvolvimento normal de muitas espécies. Corpos de sílica variam em forma e distribuição dependendo da espécie e tem valor taxonômico (ZHOU, 1995).

As plantas diferem bastante na sua capacidade de absorver Si e até mesmo genótipos de uma espécie podem apresentar concentrações diferentes, como demonstrado para a cevada por Nable et al. (1990).

A maioria das espécies vegetais pode ser classificadas como acumuladoras ou não acumuladoras de Si e variar no teor armazenado. Plantas das famílias Poaceae, Ciperaceae e Equisetaceae mostram altos níveis de acúmulo de Si (>4% Si); Brassicaceae, Urticaceae e Commelinaceae apresentam níveis de Si intermediários (2-4% Si), enquanto a maioria das espécies possui um pequeno acúmulo, com níveis abaixo de 2% (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001; HODSON et al., 2005). Plantas consideradas não acumuladoras apresentam menor densidade de transportadores de Si do apoplasto para o simplasto e um

defeito nos transportadores de Si das células do córtex para o xilema, comparadas às plantas acumuladoras (MA; MIYAKI; TAKAHASHI, 2001).

Bromeliaceae é uma família pertencente às monocotiledôneas, grupo este que apresenta espécies que são consideradas baixas acumuladoras ou não acumuladoras de Si (MA; MIYAKI; TAKAHASHI, 2001).

## **5. Fluorescência da clorofila *a***

Entre os fatores abióticos que limitam o crescimento das plantas, destacam-se os altos níveis de radiação solar incidente. O aumento exagerado da luz acima da capacidade de utilização pela fotossíntese pode resultar em uma condição de estresse conhecida como fotoinibição. A quantidade de energia radiante que atinge o complexo coletor de luz dos fotossistemas pode conduzir a um ganho ou perda na eficiência das reações fotoquímicas dos centros de reação (LEMOS FILHO, 2000).

Muitos dos efeitos do excesso de luz estão localizados no fotossistema II (FSII), e locais inibidores tanto no lado doador quanto no receptor foram identificados. Esta inibição é reversível nos primeiros estágios. Porém, estágios posteriores de inibição resultam em danos para o sistema, tal que o centro de reação do FSII precisa ser desmontado e consertado. O local principal deste dano é a proteína D1 que faz parte do centro de reação do FSII. Esta proteína é facilmente danificada através do excesso de luz e então deve ser removida da membrana e substituída por uma cópia recentemente sintetizada. As outras partes do centro de reação do FSII são projetadas para serem recicladas, assim a proteína D1 é o único componente que precisa ser sintetizado (ARO et al., 1993).

Como a fotoinibição envolve inativação fotoquímica principalmente do FSII, todos os organismos fotossintetizantes podem ser potencialmente susceptíveis à irradiância incidente. Assim, o grau de susceptibilidade está sob influência de vários fatores como: ambientais (luz, temperatura, água, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e fertilidade do solo), genotípicos (plantas de sol ou sombra), fenotípicos (inclinação da folha) e fisiológicos (metabolismo do carbono). A imposição de fatores estressantes adicionais durante a exposição à alta irradiância exacerba os efeitos adversos da luz (LONG et al., 1994).

Durante a aclimatização, é fundamental que a planta desenvolva adaptações a nova condição ambiental (APÓSTOLO et al 2005;. DURKOVIC et al. 2009). Por exemplo, o incremento substancial na irradiância estimula os mecanismos de fotoproteção das plantas

propagadas *in vitro*, o que pode levar a inibição da atividade ou fotoinibição do FSII (OSÓRIO et al., 2010; SÁEZ et al., 2012). Ambas as condições de fotoproteção reduzem a taxa de fotossíntese máxima e, conseqüentemente, ganho de carbono e o crescimento das plantas (VAN HEERDEN et al., 2007; TAKAHASHI; BADGER, 2011; ADAMS et al. 2013). Além disso, elevadas intensidades de luz pode levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que causam dano na oxidação fotoquímica (ASADA, 2006; MICHAEL; KRISHNASWAMY, 2011).

A análise de fluorescência da clorofila *a* tem sido utilizada para verificar as variações fisiológicas das plantas propagadas *in vitro* durante o processo de aclimatização (POSPÍŠILOVÁ et al., 2009; SWAIN et al. 2010). A técnica possibilita avaliações da fotossíntese com precisão e de forma não destrutiva em plantas *in vitro* e fornece dados sobre rendimento quântico fotossintético globais e capacidade fotossintética (VAN KOOTEN; SNEL, 1990; STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL, 2001; SWAIN et al. 2010). Aclimatação já foi estudada através da análise de fluorescência da clorofila *a* num número de espécies de plantas (CARVALHO et al., 2001; OSÓRIO et al., 2005, 2010, 2012; CANOVA et al., 2008; DURKOVIC et al., 2009; POSPÍŠILOVÁ et al., 2009). Estudos de aclimatização também já foram realizados em bromélias propagadas *in vitro* (ARAGÓN et al., 2012; MARTINS et al., 2015).

A emissão de fluorescência da clorofila *a* pode ser empregada como um método efetivo para medições da eficiência fotossintética (TÓTH et al., 2007; ANTAL; RUBIN, 2008; HENRIQUES, 2009), principalmente em ambientes que permitem condições de estresse fisiológico ao vegetal (STRASSER et al., 2004). Os métodos atuais para medições da emissão de fluorescência da clorofila *a* nos fornecem informações rápidas e não destrutivas de amostra a respeito da conversão, transferência e dissipação da energia luminosa em nível de FSII (STIRBET; GOVINDJEE, 2011). Gonçalves et al. (2010) observaram um rápido decréscimo na relação  $F_v/F_m$  em plantas tropicais sob elevadas irradiâncias. A razão  $F_v/F_m$  indica as condições do aparato fotossintético das folhas para o rendimento quântico fotoquímico das etapas primárias da fotoquímica da fotossíntese.

Estudos prévios indicam que o aparato fotossintético é um dos principais locais de destino de estresses abióticos (XIA et al., 2004; MEHTA et al., 2010). Entre os vários métodos para analisar a fluorescência transiente da clorofila *a*, o teste OJIP é altamente estudado para investigações *in vitro* do aparato fotossintético intacto (STRAUSS et al., 2003; XIA et al., 2004; OUKARROUM et al., 2007; THACH et al., 2007; KALAJ et al., 2010; MEHTA et al., 2010; STEFANOV et al., 2011). Este teste traduz as mudanças de forma de



OJIP para mudanças transientes quantitativas de vários parâmetros, chamados JIP, que são baseados na teoria de fluxo de energia em membranas de tilacóides. Estes parâmetros são a absorção de luz (ABS), captura de energia de excitação (TR) e conversão da energia de excitação para o transporte fotossintético de energia (ET) por centro de reação (CR) ou por amostra de área chamada de secção transversal (CS) (STRASSER et al., 2000; STRASSER et al., 2004; OUKARROUM et al., 2007). O teste OJIP pode ser usado para investigar, ponto por ponto, as frações de mudanças do FSII, porque mudanças no comportamento do FSII ocorrem quando as plantas são expostas a estresses ambientais. Este teste pode traduzir o estado fisiológico do FSII para parâmetros biofísicos em condições diferentes (STRASSER et al., 2004).

## 6. Anatomia

As condições sob as quais se dá o cultivo *in vitro*, em relação à composição do meio de cultivo e do ambiente no interior dos recipientes, bem como quanto à luminosidade e à temperatura, fazem com que a planta cultivada nestas condições apresente algumas características em relação às folhas, às raízes e ao mecanismo de nutrição da plântula (PASQUAL, 2001).

Alterações na morfologia foliar das plantas podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos associados, principalmente, à fotossíntese e à transpiração. Muitas dessas evidências indicam que o estado da água e a fase gasosa durante os vários estágios da cultura são a chave dos fatores envolvidos na desorganização morfológica *in vitro* (COSTA et al., 2009).

As plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar características peculiares como: diferenciação dos tecidos foliares, abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida capacidade de sustentação (esclerênquima e colênquima), estômatos não funcionais, baixa atividade autotrófica e outros tipos de desordens (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996; MAJADA et al., 2000). De acordo com Preece e Compton (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando submetidos a condições adversas, como a aclimatização.

Pasqual et al. (1997) afirmam que, durante o processo de transferência para a condição *ex vitro*, a cutícula é freqüentemente menos desenvolvida em razão da umidade

relativa no interior dos frascos ser relativamente alta. Como consequência, ocorre elevada perda de água durante o processo de aclimatização. As modificações manifestadas, principalmente nas folhas, afetam os principais processos executados por elas, ou seja, a fotossíntese e as trocas gasosas. O ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta. Algumas respostas, comumente, assemelham-se a plantas cultivadas sob condições de estresse (DEBERGH; MAENE, 1984).

Em bromeliáceas, já são descritas estruturas anatômicas foliares características, tais como: presença de ceras, tricomas, epiderme uniestratificada revestida por cutícula, com diâmetro maior perpendicular ao eixo da folha e presença de hipoderme. O mesofilo apresenta tecido aquífero logo abaixo da face adaxial da epiderme, parênquima clorofilado ou não, onde estão os feixes vasculares, cordões de fibras isolados e canais de aeração (PITA; MENEZES, 2002; SCARANO et al., 2002; PROENÇA; SAJO, 2004; SEGECIN; SCATENA, 2004; SCATENA; SEGECIN, 2005; SOUSA et al., 2005; HORRES et al., 2007; VOLTOLINI; SANTOS, 2011).

Assim, estudos anatômicos podem auxiliar na compreensão de vários fenômenos relacionados à estrutura interna dos vegetais, bem como nos estudos de identificação taxonômica. As respostas morfogenéticas obtidas nas plantas cultivadas *in vitro* podem ser na confirmadas mediante análise anatômica (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

A análise da anatomia foliar de plantas propagadas *in vitro* é de grande importância para estudos comparativos do desenvolvimento de seus tecidos e de estruturas adaptativas, como espessura de cutícula, disposição de células, dimensão e número de estômatos, entre outros. Esses estudos podem servir de base para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento durante a aclimatização, a qual se caracteriza por uma elevada mortalidade, muitas vezes, inviabilizando a micropropagação de algumas espécies (ABBADÉ et al., 2009).

Em relação a estudos com silicatos, a análise da anatomia foliar também mostra que os depósitos de Si, comumente chamados de silicofitólitos, ocorrem na parede celular como incrustação e ou impregnação ou, ainda, sob a forma de corpos silicosos (opala) no interior das células de diferentes tecidos (METCALFE, 1983).

## Referências Bibliográficas

ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M.; CENTOFANTE, A. R.; OLIVEIRA, C. Anatomia foliar de ipê- Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.) – (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro e in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences** Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.

ADAMS, W.W.; MILLER, O.; COHU, C.M.; DEMMIG-ADAMS, B. May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? **Photosynth Res** 117:31–44. 2013.

AMADO, F. G. M.; ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; MALM, O. Hg localization in *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae), an atmospheric biomonitor. **Atmospheric environment**, v. 36, p. 881-887, 2002.

ANTAL, T.; RUBIN, A. *In vivo* analysis of chlorophyll *a* fluorescence induction. **Photosynthesis Research**, v. 96, p. 217-226. 2008.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 404 p., 2012.

APÓSTOLO, N.; BRUTTI C, LLORENTE B Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cell Dev Biol Plant** 41:307–313. 2005.

ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMANCIO, S. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. **Plant Cell Rep.**, 31:757-769, 2012.

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ A. P. M. Bromeliad. In: ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, A. P. M. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. IV Piracicaba: **Global Science Books**. Cap. 73, p. 644-655, 2006.

ARANDA-PEREZ, A. N.; PERES, L. E. P.; HIGASHI, E. N.; MARTINELLI, A. P. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. **HortScience**, Alexandria, n. 44, p. 106-112, 2009.

ARO, E.M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1143, n.2, p.113–134, 1993.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiol** 141:391–396. 2006.

ASHMORE, S. E. The Status of *in vitro* conservation of tropical and subtropical species. Proceedings of the International Symposium on Biotechnology Tropical & Subtropical Species. **Acta Horticulturae** 461: 477–483. 1998.

BARROS, I. P. I.; SOUZA, P. L. Coleta de germoplasma de *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS

GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1995, Campinas. Anais... Campinas: **EMBRAPA-CENARGEN**, p.17. 1995.

BALLS, A. K.; THOMPSON, R. R.; KIES, M. W. Bromelain – Properties and commercial production. **Industrial Engineering Chem.** P. 33- 950, 1941.

BITTENCOURT, A. M.; PÖLZI, P. F. K.; BLUM, C. T.; HOFFMANN, T.; SANTOS, A. J. Aspectos econômicos das bromélias no Estado do Paraná. In: Congresso ibero-americano de pesquisa e desenvolvimento de produtos florestais, Curitiba. **Caderno de Resumos**. Curitiba: UFPR, p. 134, 2002.

BRAGA, F. T.; NUNES, C. F.; FAVERO, A. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária**. 2009.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., Eds., Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq**, v. 1, p. 87-132, 1998.

CAMARGO, M.S.; KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, H.S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia** 66: 637-647. 2007.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatização de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias**, v. 25, p. 1-5, 1996.

ČAŇOVÁ, I.; ĎURKOVIČ, J.; HLADKÁ, D. Stomatal and chlorophyll fluorescence characteristics in European beech cultivars during leaf development. **Biol Plant** 52:577–581. 2008.

CARNEIRO, L. A.; MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de bromeliaceae. **Vidalia**, 2(1): 12-20, 2004.

CARVALHO L. C.; OSÓRIO M. L.; CHAVES M. M.; AMÂNCIO S. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. **Plant Cell Tissue Organ Cult** 67:271–280. 2001.

CARVALHO, L. F. N. O cultivo da bromélia. São Paulo: **TJV**, p. 32, 2002.

COGLIATTI-CARVALHO, L.; FREITAS, A. F. N.; ROCHA, C. F. D.; SLUYS, M. Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v. 24, n. I, p. 1-9, 2001.

COSER, T. S.; VERSIEUX, L. M.; WENDT, T. *Alcantarea galactea* (Bromeliaceae), a New Giant Bromeliad from Brazil, with Populations Seen from the Sky. **Systematic Botany**, 2013.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Revista Ciência Rural**, 39:742-748. 2009.

- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. **Parasitica**, Gembloux, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.
- DEREN, C. W.; DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; MARTIN, F. G. Silicon concentration, disease response, and yield components of rice genotypes grown on flooded organic histosols. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 3, p. 733-737, 1994.
- DIAZ, N. A. M. **Enzimas em panificação**. In: Vitti, P. Seminário sobre uso de enzimas em biscoitos e panificação. Campinas, Ital, 19-26. 1988.
- ĐURKOVIČ, J.; ČAŇOVÁ, I.; PICHLER, V. Water loss and chlorophyll fluorescence during *ex vitro* acclimatization in micropropagated black mulberry (*Morus nigra* L.). **Prop. Ornam. Plants** 9:107–112. 2009.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. **Euphytica**, 57: 227–43. 1991.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annu. Rev. Plant Physiol**, 50, 641-664, 1999.
- EPSTEIN, E. Silicon: its manifold roles in plants. **Ann. Appl. Biol.** 155, 155-160, 2009.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.
- GONÇALVES, J. F. C.; SILVA, C.E.; GUIMARÃES, D. G.; BERNARDES, R. S. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica**, v.40, n.1, p.89-98, 2010.
- GOTTARDI, S.; LACUZZO, F.; TOMASI, N.; CORTELLA, G.; MANZOCCO, L.; PINTON, R.; ROMHELD, V.; MIMMO, T.; SCAMPICCHIO, M.; DALLA COSTA, L.; CESCO, S. Beneficial effects of silicon on hydroponically grown corn salad (*Valerianella locusta* (L.) Laterr) plants. **Plant Physiol. Biochem.** 56, 14-23, 2012.
- GUERRA, M. P.; VESCO, L. L .D. Strategies for the micropropagation of bromeliads. In: Jain SM, Ochatt SJ (eds) *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: methods in molecular biology*. **Humana Press**, New York, pp 47–66, 2010.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990, P. 99-169.
- HEINICKE, R. M.; GORTNER, W. A. Stean bromelain: A new protease preparation from pineapple plants. **Economic Botany**, v. 11, p. 225, 1957.

HENRIQUES, F. S. Leaf Chlorophyll Fluorescence: Background and Fundamentals for Plant Biologists. **Botanical Review**, v. 75, p. 249-270. 2009.

HODSON, M. J.; WHITE, P. J.; MEAD, A.; BROADLEY, M. R. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. **Annals of botany**, London, v. 96, p. 1027-1046, 2005.

HORRES, R.; SCHULTE, K.; WEISING, K.; ZIZKA, G. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) evidence from molecular and anatomical studies. **Aliso**, v.23, p.27- 43, 2007.

KALAJ, H. H.; GOVINDJEE BOSA, K.; KOSCIELNIAK, J.; ZUK-GOLASZEWSKA, K. Effects of salt stress on photosystemII efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. **Environ. Exp. Bot.**, in press. 2010.

KANASHIRO, S. **Efeitos de diferentes substratos na produção da espécie *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker em vasos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia).Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – Esalq, 1999. 79p.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇALVES, A. N.; DEMÉTRIO, V. A.; JOCYS, T.; TAVARES, A. R. Effect of calcium on the *in vitro* growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith plantlets. **Journal of Plant Nutrition** 32: 867-877. 2009.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

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

KORNDORFER, G. H.; DATNOFF, L. E. Papel do silício na produção de cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE CANA-DE-AÇÚCAR DE PIRACICABA, 5., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fealq, 2000. p. 53-61.

KRUMREICH, F. D.; CORRÊA, A. P. A.; SILVA, S. D. S.; ZAMBIAZI, R. C. Composição físico-química e de compostos bioativos em frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n.2, Jaboticabal, 2015.

LEME, E. M. C.; KOLLMANN, L. J. C.; FONTANA, A. P. Three New *Cryptanthus* Species from Espírito Santo and Bahia, Brazil. **Journal of the Bromeliad Society** 58: 12-19. 2008.

LEME, E. M. C.; FONTANA, A. P.; ALBRITTER, H. Three New *Pitcairnia* Species (Bromeliaceae) from the Inselbergs of Espírito Santo, Brazil. **Systematic Botany** 35: 487–496. 2010a.

LEME, E. M. C.; FRAGA, C. N.; KOLLMANN, L. J. C.; BROWN, G. K.; TILL, W.; RIBEIRO, O. B. C.; MACHADO, M. C.; MONTEIRO, F. J. S.; FONTANA, A. P. Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. **Rodriguésia** 61: 21-67. 2010b.

LEME, E. M. C.; KOLLMANN, L. J. C. New species and a new combination of Brazilian Bromeliaceae. **Phytotaxa** 16: 1–36. 2011.

LEMOS-FILHO, J. P. Fotoinibição em três espécies do cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysentericae* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuvosa. **Revista Brasileira de Botânica**, 23: 45-50, 2000.

LIANG, Y. C.; SUN, W.; ZHU, P. C. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 147, p. 422-428, 2007.

LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 45: 633-662, 1994.

LUTHER, H. E. An alphabetical list of bromeliad binomials. Florida: **Bromeliad Society Internacional**, 45 p. 2010.

MA, J. F. **Study on physiological role of silicon in rice plants**. Master thesis, Kyoto University. 1988.

MA, J. F. **Studies on beneficial effects of silicon on rice plants**. Ph.D. Thesis, Kyoto University. 1990.

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATINOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.) *Silicon in agriculture*. Amsterdam: **Elsevier Science**, p. 17-39. 2001.

MA, J.F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses, **Soil Sci. Plant Nutr.**, 50 11-18. 2004.

M.A., J. F.; YAMAJI, N. A silicon transporter in rice. **Nature**, London, v. 440, p. 688-691, 2006.

MA, J. F.; YAMAJI, N. Functions and transport of silicon in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 65, p. 3049-3057, 2008.

MACCIÓ, L.; VALLES, D.; CANTERA, A. M. Proteolytic enzymes from *Bromelia antiacantha* as tools for controlled tissue hydrolysis in entomology. **Springer plus**, v. 9; 2(1): 307. 2013.

MAJADA, J. P.; TADEO, F.; FAL, M. A.; SANCHEZ-TAMES, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 63: 207-214. 2000.

MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RIO, J. C. Chemical characterization of lignin and lipophilic fractions from leaf fibers of curaua. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.55, n.4, p.1327-36, 2007.

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

MARTINOTTO, C. **Cultivo *in vitro* e aspectos morfológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)**. 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MARTINS, J. P. R.; SCHIMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S.; FALQUETO, A. R.; OTONI, W. C. Chlorophyll *a* fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 51:471- 481. 2015.

MARTINS, J. P. R.; PASCAL, M.; MARTINS, A. D.; RIBEIRA, S. F. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** v. 126, p. 43-57, 2016.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica* an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal Bromeliad**, 44:120-124, 1994.

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

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In – Biotechnology in Agriculture and Forestry, ed. Bajaj Y.P.S. **Springer-Veriag**, Berlin, Germany, 40 p. 43-57, 1997.

MERCIER, H.; YOSHIDA, M. K. Bromelian activity leaf tissue of *Bromelia antiacantha*. **Journal of the Bromeliad Society**, v.48, n.2, p.6-10, 1998.

MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, 1(1): 57-62. 2003.

METCALFE, C. R. Secretary mineral substances – Silica. In: METCALFE, C. R.; CHARLK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Claredon, v. 2, p. 82-94, 1983.

MEHTA, P.; JAJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 48, p. 16-20, 2010.

MICHAEL, P.I.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environ Exp Bot** v. 74, p. 171–177, 2011.

MURACHI, T.; NEURATH, H. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 235, n. 1, 1960.

NABLE, R. O.; LANCE, R. C. M.; CARTWRIGHT, B. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. **Annals of Botany**, London, v. 66, n. 1, p. 83-90, 1990.

NAVES, V. C. **Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcanterea imperialis* (Carrière) Harms.** Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 76p. 2001.



- NUNES, J. V. C.; FORZZA, R. C. Bromélia. In: I Seminário Nacional de Recursos Florestais da Mata Atlântica, São Paulo. **Anais do Primeiro Seminário Nacional de Recursos Florestais da Mata Atlântica**, p. 40-44, 2000.
- NUNES, J. V. C. **Bromélias**. IN: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (ed). Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais, São Paulo: **SENAC**, p.119-132. 2002.
- OLIVEIRA, R. R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta bot. bras.** 18(4): 793-799. 2004.
- OSÓRIO, M. L.; GONÇALVES, S.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Effects of CO<sub>2</sub> concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. **Biol Plant** 49:161–167. 2005.
- OSÓRIO, M. L.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Chlorophyll fluorescence in micropropagated *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* plants in response to different irradiances. **Biol Plant** 54:415–422. 2010.
- OSÓRIO, M. L.; OSÓRIO, J.; GONÇALVES, S.; DAVID, M. J.; ROMANO, A. Carob trees (*Ceratonia siliqua* L.) regenerated in vitro can acclimatize successfully to match the field performance of seed derived plants. **Trees** 26:1837–1846. 2012.
- OUÉDRAOGO, A. S. Conservation and use of forest genetic resources. In: WORLD FORESTRY CONGRESS, 11., Antalya. **Anais... FAO**, 1997. v.2, p.173-188. 1997.
- OUKARROUM, A.; EL MADIDI, S.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and rewatering. **Environ. Exp. Bot.**, 60, 438-446. 2007.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras UFLA/FAEPE, 159p., 1997.
- PASQUAL, M. **Texto acadêmicos, meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 127 p., 2001.
- PITA, P. B.; MENEZES, N. L. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.1, p.25-34, 2002.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HAISEL, D.; BAŤKOVÁ, P. Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during ex vitro transfer of micropropagated tobacco plantlets. **Biol Plant** 53:11–20. 2009.
- PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: 17 – high-tech and micropropagation I*. Berlin: **Springer Verlag**, p. 168-189. 1991.

- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.2, p.319-331, 2004.
- RICHMOND, K. E.; SUSSMAN, M. R. Got Silicon? The non-essential, beneficial plant nutrient. **Current Opinions in Plant Biology**, Cambridge, v. 6, p. 268-272, 2003.
- RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cell Dev Biol-Plant**. 38(2):116–124. 2002.
- RAVEN, J. A. Cycling silicon e the role of accumulation in plants e commentary, **New Phytol.**, 153, 419-421. 2003.
- RECH-FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O. LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1799-1808. 2005.
- REITZ, R. Bromeliáceas e malaria-bromélia endêmica. Itajaí, **Herbário Barbosa Rodrigues**. p.808, 1983.
- RIBEIRO, J. F.; SILVA, J. C. S. Manutenção e recuperação da biodiversidade do bioma cerrado: o uso de plantas nativas. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS 1., 1996, Brasília. Anais... Planaltina: **Embrapa-CPAC**, p. 10-14. 1996.
- RIBEIRO, M. B. Fibrocultura: o Semi-Árido é o paraíso das fibras vegetais. In: RIBEIRO, M. B. (Ed.) A potencialidade do semi-árido brasileiro. Brasília: **Revan**, p. 121-136. 2007a.
- ROCHA, C. F. D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; ALMEIDA, D. R.; FREITAS, A. F. N. Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. **Bromelia** 4: 7-10. 1997.
- SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; SÁEZ, K. L.; SANCHEZ-OLATE, M.; LATSAGUE, M. I.; RÍOS, D. G. Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: a comparison between in vitro and nursery plants. **Biol Plant** 56:15–24. 2012.
- SCARANO, F. R.; DUARTE, H. M.; RÔÇAS, G.; BARRETO, S. M. B.; AMADO, E. F.; REINERT, F.; WENDT, T.; MANTOVANI, A.; LIMA H. R. P.; BARROS, C. F. Acclimation or stress symptom? An integrated study of intraspecific variation in the clonal plant *Aechmea bromeliifolia*, a widespread CAM tank bromeliad. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.140, n.4, p.391-401, 2002.
- SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.3, p.635- 649, 2005.
- SCHMITT, M. Ingredients. **Food Marketing and Technology**, v.8, p. 14-16, 1994.
- SEGECIN, S.; SCATENA, V. L. Anatomia de escapos de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.3, p.515-525, 2004.

- SOUSA, G. M.; ESTELITA, M. E. M.; WANDERLEY, M. G. L. Anatomia foliar de espécies brasileiras de *Aechmea* subg. *Chevaliera* (Gaudich. ex Beer) Baker, Bromelioideae-Bromelioideae. **Revista Brasileira Botânica**, v.28, n.3, p.603-613, 2005.
- STEFANOV, D.; PETKOVA, V.; DENEV, I. D. Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using JIP-test. **Scientia Horticult.**, 128, 1-6, 2011.
- STIRBET, A., GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and PhotoBiology**. 2011 (in press.).
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, Probing photosynthesis; mechanisms, regulation and adaptation, Yunus, M., Pathre U., Mohanty P., Ed., London: **Taylor and Francis**, p. 445-483. 2000.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Stress in plants, from daily rhythm to global changes, detected and quantified by the JIP-test. **Chim Nouv** 75:3321–3326. 2001.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) Chlorophyll *a* Fluorescence: A signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration series. **Springer**, Dordrecht, pp 321–362, 2004.
- STRAUSS, A. J.; KRUGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN HEERDEN, P. D. R. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. **Environ. Exp. Bot.**, v. 56, p. 147-157, 2003.
- SWAIN, S. S.; TRIPATHY, T.; MOHAPATRA, P. K.; CHAND, P. K. Photosynthetic and transpiration responses of in vitro-regenerated *Solanum nigrum* L. plants to ex vitro adaptation. **In Vitro Cell Dev Biol Plant** v. 46, p. 134–141, 2010.
- TAKAHASHI, S.; BADGER, M. R. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. **Trends Plant Sci** v. 16, p. 53–60, 2011.
- TAUSSIG, S. J.; SZEKERCZES, J.; BATKIN, S. Inhibition of tumors growth *in vitro* by bromelain, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosus*). **Journal of Medicinal Plant research**, v. 6, p. 583-639, 1985.
- TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P.; BARROSO, T. C. S. Flores Tropicais. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. 225p. 2005.
- TÓTH, S. Z.; SCHANKER, G.; STRASSER, R. J. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP – transient. **Photosynthesis Research**, v.93, n.1, p.193-203, 2007.
- THACH, L.B.; SHAPCOTT, A.; SCHMIDT, S. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. **Photosynth. Res.**, v. 94, p. 423-436, 2007.

TUNA, A.L.; KAYA, C.; HIGGS, D.; MURILLO-AMADOR, B.; AYDEMIR, S.; GIRGIN, A.R. Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. **Environ. Exp. Bot.**, 62, 10-16, 2008.

VAN HEERDEN, P. D. R.; SWANEPOEL, J. W.; KRÜGER, G. H. J. Modulation of photosynthesis in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO<sub>2</sub> assimilation. **Environ Exp Bot** 61:124–136. 2007.

VAN KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence and other noninvasive spectroscopic techniques in plant stress physiology. **Photosynth Res** 25:146–332. 1990.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. A new species of *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, Bromeliaceae. **Hoehnea** 34: 409–413. 2007.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. Delimitation of the *Alcantarea extensa* complex (Bromeliaceae) and a new species from Espírito Santo, Brazil. **Rodriguésia** 61(3): 421-429. 2010.

VOLTOLINI, C. H.; SANTOS, M. Variações na morfoanatomia foliar de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae) sob distintas condições ambientais. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.1, p.2-10, 2011.

YEO, A. R.; FLOWERS, S. A.; RAO, G.; WELFARE, K.; SENANAYAKE, N.; FLOWERS, T. J. Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpiration bypass flow. **Plant Cell Environ.** 22, 559-565, 1999.

WHITAKER, J. R. **Practical applications of enzyme technology. Enzymes - Use and Control in Food**, 1976.

XIA, J., L. I, Y.; ZOU, D. Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. **Aquatic Bot.**, 80, 129-137, 2004.

ZHOU, T.S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, 1995.

## CAPÍTULO II

### Efeito de diferentes meios de cultivo na germinação, crescimento e fisiologia *in vitro* de *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae)

#### RESUMO

O cultivo *in vitro* representa uma tecnologia de grande aplicabilidade para a micropropagação e conservação de germoplasma vegetal. Porém, para cada espécie, é necessário determinar o meio de cultivo mais adequado para o estabelecimento *in vitro*, de modo a garantir adequada nutrição para as plantas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi definir um meio de cultivo para o estabelecimento *in vitro* de *B. antiacantha*, uma bromeliácea de hábito terrestre, nativa da Mata Atlântica, com grande potencial para uso medicinal, alimentício, ornamental e industrial. Foram utilizadas sementes de frutos maduros provenientes de populações naturais, as quais, após a desinfestação, foram submetidas a tratamentos em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com diferentes concentrações de sais MS: T1) Meio MS 0% (testemunha), T2) Meio MS 25%, T3) Meio MS 50%, T4) Meio MS 75% e T5) meio MS 100%, acrescidos de sacarose 30,0 g L<sup>-1</sup> e ágar 8,0 g L<sup>-1</sup>. Após a inoculação das sementes, o material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob intensidade luminosa de 25  $\mu\text{mol.m}^{-2} .\text{s}^{-1}$ , à temperatura de 26  $\pm$  1 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado consistindo de 13 repetições por tratamento (cada repetição continha quatro sementes por frasco). A germinação foi avaliada diariamente para a determinação do Índice de Velocidade de Germinação (IVG), do Tempo Médio de Germinação (TMG) e, ao final de 90 dias foram avaliados Porcentagem de Germinação (G%), parâmetros de crescimento, e análises da eficiência fotossintética por meio de medidas da fluorescência da clorofila *a*. Os dados foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A porcentagem de germinação das sementes foi alta e independente do tratamento, chegando a 98% no meio MS 0%. O maior valor de IVG foi obtido em MS 0% (0,17). Por conseguinte, o menor valor de TMG foi obtido em MS 0% (68,38), o qual não diferiu daquele observado em MS 25% (90,76). Isso mostra que os meios com menor concentração de sais MS (MS 0% e MS 25%) apresentaram as melhores respostas para germinação *in vitro* de *B. antiacantha*. Para os parâmetros de crescimento não houve diferença significativa entre os tratamentos. Os resultados da fluorescência transiente OJIP e da análise do teste JIP mostram a ocorrência de fotoinibição nas plantas cultivadas no meio

MS 0%, o que afeta de forma prejudicial o aparato fotossintético. Enquanto que as concentrações intermediárias (MS 25% e MS 50%) mostraram bons resultados para a funcionalidade do aparato fotossintético.

Palavras chave: germinação; cultivo *in vitro*; meio MS; fluorescência da clorofila *a*

## ABSTRACT

The *in vitro* culture is wide applicability technology for micropropagation and germplasm conserving plant. However, for each species, it is necessary to determine the most suitable culture medium for *in vitro* establishment, to ensure appropriate nutrition for the plants. In this sense, the objective was to define a culture medium for the *in vitro* establishment of *Bromelia antiacantha*, a terrestrial habit of bromeliad, native to the Atlantic Forest, with great potential for medical use, food, ornamental and industrial. Seeds were used of ripe fruit from natural populations, which, after disinfection, underwent treatment on MS medium (Murashige; Skoog, 1962) with different concentrations of MS salts: T1) Medium MS 0 (control), T2 ) Medium MS 25%, T3) Medium MS 50%, T4) Medium MS 75% and T5) Medium MS 100%, plus sucrose 30,0 g L<sup>-1</sup> agar and 8,0 g L<sup>-1</sup>. After inoculation of the seeds, the material was kept in growth room with photoperiod of 16 hours under light intensity 25  $\mu\text{mol.m}^{-2} .\text{s}^{-1}$  at a temperature of  $26 \pm 1$  °C. The experimental design was completely randomized consisting of 13 replicates per treatment (each replicate contained four seeds per bottle). Germination was evaluated daily for determining the Speed of germination index (IVG), the Mean time of germination (TMG) and at the end of 90 days were evaluated Percentage of germination (G%), growth parameters, and analysis of photosynthetic efficiency through measures of chlorophyll *a* fluorescence. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The percentage of seed germination was high and independent of treatment, reaching 98% in medium MS 0%. The greatest value of IVG was obtained in MS 0% (0.17). Therefore, the smaller value of TMG was obtained on MS 0% (68,38), which did not differ from that observed in MS 25% (90,76). This shows that the means with lower concentration of MS salts (MS 0% and 25% MS) showed the best responses to *in vitro* germination of *B. antiacantha*. For the growth parameters did not differ between treatments. The results of the transient fluorescence OJIP and JIP test analysis shows the photoinhibition occurring in plants grown in medium MS 0%, which affects preliminary forms the photosynthetic apparatus. While intermediate concentrations (MS 25% and 50% MS) showed good results for the functionality of the photosynthetic apparatus.

Keywords: germination; *in vitro* culture; MS medium; chlorophyll *a* fluorescence

## 1. INTRODUÇÃO

Bromeliaceae é considerada uma das famílias de monocotiledôneas neotropicais mais diversas, com 58 gêneros e aproximadamente 3.250 espécies (LUTHER, 2010), sendo o Brasil o país com maior riqueza, abrigando cerca de 44 gêneros e 1290 espécies (FORZZA et al. 2013). No Espírito Santo, a família Bromeliaceae merece destaque pela diversidade e alto grau de endemismo, estando o Estado entre os mais diversos da Mata Atlântica (MARTINELLI et al., 2008; FORZZA et al., 2013).

Bromeliaceae é a família de plantas com maior número de interações com outros organismos. Isso se deve a muitas espécies apresentarem folhas com disposição alterno-espinaladas formando um tanque que acumula água do dossel (bromélias-tanque), sendo considerados microhabitats com alto grau de complexidade para diversos grupos animais e vegetais, podendo inclusive, funcionar como amplificadores de biodiversidade (GONÇALVES-SOUZA et al., 2011).

As bromélias apresentam grande valorização comercial como planta ornamental, devido à beleza de suas folhas e flores (VESCO et al., 2011). Por essa razão, a coleta ilegal em ambientes naturais tem sido realizada com a finalidade de complementação de renda e vem colocando algumas espécies na categoria de ameaça de extinção (NEGRELLE et al., 2012).

Técnicas de propagação *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para a rápida multiplicação de diferentes espécies de plantas economicamente importantes ou de espécies ameaçadas de extinção. Estas técnicas são realizadas também com espécies da família Bromeliaceae, tais como *Vriesea hieroglyphica* (MERCIER; KERBAUY, 1997), *Dyckia distachya* (POMPELLI; GUERRA, 2005), *Vriesea reitzii* (RECH FILHO et al., 2005; VESCO et al., 2014), *Nidularium minutum* (KURITA et al., 2014), *Billbergia zebrina* (MARTINS et al., 2015), *Vriesea cacuminis* (RESENDE et al., 2016), entre outras.

O cultivo *in vitro* de sementes pode ser considerado uma técnica de grande importância na conservação de germoplasma de espécies ameaçadas, visto que a emergência da planta ocorre em um tempo mais reduzido, quando comparado ao processo natural, além de um número muito maior de sementes germinarem (MERCIER; KERBAUY, 1997; ERIG; SCHUCH, 2005). Para bromélias isso é interessante, pois as taxas de germinação destas no ambiente natural, em geral, são baixas (MERCIER; KERBAUY, 1995). Adicionalmente, a plântula obtida pode funcionar como matriz para um posterior processo de clonagem, chamado de micropropagação, produzindo plantas em larga escala devido a alta taxa de



multiplicação e auxiliando na redução da atividade extrativista pela oferta de mudas de plantas saudáveis (ERIG; SCHUCH, 2005).

Um dos fatores que influenciam o crescimento *in vitro* de plantas são os nutrientes minerais presentes no meio de cultivo, uma vez que desempenham importante papel no processo de propagação (RAMAGE; WILLIAMS, 2002; NIEDZ; EVENS, 2007). Para um processo eficiente, os nutrientes requeridos podem variar e funcionar de forma diferente dependendo da espécie, genótipo ou da técnica utilizada. Estas diferenças levaram a modificações nos meios de cultivo existentes ou até mesmo a novas formulações (GONÇALVES et al., 2005; GREENWAY et al., 2012).

A forma como um tecido cresce, sua extensão e qualidade das respostas morfogenéticas são fortemente influenciadas pelo tipo e concentração de nutrientes fornecidos. As primeiras pesquisas desenvolvidas por Gautheret (1939), White (1942), Hildebrandt et al. (1946), Heller (1953) e Nitsch e Nitsch (1956) levaram ao desenvolvimento do meio MS por Murashige e Skoog (1962). Os benefícios da otimização dos nutrientes do meio de cultivo são bem documentados por meio de uma ampla gama de espécies e aplicações (LEBLAY et al. 1991; MERCIER; KERBAUY, 1994; PODDAR et al., 1997; ELKONIN; PAKHOMOVA, 2000; NAVES, 2001; LELJAK-LEVANIC et al., 2004; SIVAKUMAR et al. 2005; TAMAKI et al., 2007; ARANDA-PEREZ et al., 2009; NOGUEIRA et al, 2014; KURITA et al., 2014).

Embora o meio MS completo seja o mais utilizado no cultivo *in vitro* de tecidos vegetais, para algumas espécies, uma diluição dos macronutrientes pode ser mais indicada (CALDAS et al. 1998). Isso foi comprovado em estudos com arnica (*Lychnophora pinaster*) (SOUZA, 2003), murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) (NOGUEIRA et al, 2004), erva-cidreira (*Melissa officinalis*) (REIS et al., 2008). Os autores verificaram, que concentrações de MS 25% para *L. pinaster* e *M. officinalis* e 50% para *B. intermedia* fornecem os melhores resultados quanto ao aumento da porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação. Diluições do meio MS também têm sido utilizadas no cultivo *in vitro* de espécies de bromélias como relatado para *Vriesea hieroglyphica* (MERCIER; KERBAUY, 1994), *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene (TAMAKI et al., 2007), *V. friburgensis* Mez e *V. unilateralis* (Baker) Mez (ARANDA-PEREZ et al., 2009).

A utilização de diluições do meio MS possibilita uma redução de custos, o que é bastante desejável em laboratórios comerciais de micropropagação (TAMAKI, 2007) e muito vantajoso para a conservação *in vitro* de germoplasma vegetal, já que está pode ser a médio e longo prazo (ENGELMANN, 1998; COSTA NUNES et al., 2003).

O uso de ferramentas importantes, como a análise de fluorescência da clorofila *a* tem sido utilizada para verificar as variações fisiológicas que ocorrem nas plantas propagadas *in vitro* (POSPÍŠILOVÁ et al., 2009; SWAIN et al. 2010). A técnica possibilita avaliações da fotossíntese com precisão e de forma não destrutiva em plantas *in vitro* e fornece dados sobre rendimento quântico fotossintético global e capacidade fotossintética (VAN KOOTEN; SNEL, 1990; STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL, 2001; SWAIN et al., 2010).

Partindo dessa idéia e com os bons resultados vistos na literatura com diluições do meio MS com outras espécies de plantas, verificou-se a necessidade de testar diferentes concentrações do meio de cultivo MS para a espécie *Bromelia antiacantha*.

### **Objetivo Geral**

Definir um meio de cultivo para o estabelecimento *in vitro* de *B. antiacantha*.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar o efeito de diferentes concentrações do meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sobre a germinação *in vitro* de sementes de *B. antiacantha*;
2. Avaliar o efeito de diferentes concentrações do meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sobre os parâmetros de crescimento *in vitro* de *B. antiacantha*;
3. Avaliar o efeito de diferentes concentrações do meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sobre a eficiência fotossintética das plântulas de *B. antiacantha* estabelecidas *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Sementes foram retiradas de frutos maduros de *B. antiacantha* coletados em três locais no município de São Mateus – ES: bairro Liberdade, norte de Guriri e sul de Guriri. Em seguida foram lavadas em água corrente para a remoção da mucilagem, secas em papel absorvente, acondicionadas em envelopes de papel e armazenadas em geladeira.

O voucher do espécime-testemunho de *B. antiacantha* foi depositado no Herbário São Mateus Espírito Santo (SAMES) sob o número 01013.

Para a montagem do experimento foi criado um *bulk* de sementes, em que sementes de dois ou mais frutos de cada indivíduo foram misturadas às sementes dos demais indivíduos, a fim de obter uma amostra representativa da diversidade populacional de *B. antiacantha* presente nos locais de coleta.

### 2.2 Cultivo *in vitro*

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais na Universidade Federal do Espírito Santo – Centro Universitário Norte do Espírito Santo (UFES- CEUNES).

#### 2.2.1 Germinação

As sementes foram submetidas à desinfestação com etanol 70% por cinco minutos, seguida por solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) com três gotas de Tween 20 por cinco minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril.

Após a desinfestação, as sementes foram submetidas a tratamentos em meio MS, com diferentes concentrações de sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962): T1) Meio MS 0% (testemunha), T2) Meio MS 25%, T3) Meio MS 50%, T4) Meio MS 75% e T5) meio MS 100% (MS completo). Todos os meios foram suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificados com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e tiveram o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120° C, durante 20 minutos. Após a inoculação, o material vegetal foi mantido por 90 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 25  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura de 26  $\pm$  1 ° C.

A germinação foi avaliada diariamente para determinação do Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e ao final de cerca de 90 dias foi avaliada a Porcentagem de Germinação (G%). A avaliação do IVG e TMG consta de contagem visual de sementes germinadas a cada dia, durante 90 dias. A semente foi considerada germinada quando houve a emissão da raiz primária. As variáveis foram calculadas com as seguintes fórmulas:

Porcentagem de germinação (G%): calculada de acordo com Labouriau e Valadares (1976) pela fórmula  $G = (N/A) \times 100$ , em que: N = número de sementes germinadas ao final do experimento; A= número total de sementes colocadas para germinar. Unidade: %.

Índice de velocidade de germinação (IVG): calculado de acordo com Maguire (1962) pela fórmula  $IVG = \sum (ni/ti)$ , em que: ni = número de sementes que germinaram no tempo "i"; ti = tempo após instalação do experimento. Unidade: adimensional.

Tempo médio de germinação (TMG): calculado de acordo com Labouriau e Valadares (1976) pela fórmula  $TMG = (\sum niti)/\sum ni$ , onde: ni = número de sementes germinadas por dia; ti = tempo de incubação. Unidade: dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) consistindo de 13 repetições por tratamento, onde cada repetição continha quatro sementes por frasco, representando assim 52 sementes por tratamento e 260 sementes no total do experimento.

Para a avaliação da melhor condição para o estabelecimento *in vitro* de *B. antiacantha*, ao final dos 90 dias foram avaliados parâmetros de crescimento e realizadas análises fisiológicas.

### **2.2.2 Análise de parâmetros de crescimento**

As avaliações iniciaram-se aos 90 dias após a germinação *in vitro*. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de folhas (NF) e número de raízes (NR); comprimento aéreo (CA) e comprimento radicular (CR), ambos em cm; e área foliar (AF) em cm<sup>2</sup>.

Os valores de NF e NR foram obtidos por contagem direta das folhas e raízes. A determinação do CA e do CR foi por meio de medição através de régua graduada do comprimento da maior folha e da maior raiz da plântula. Para determinação da AF, cada folha foi desenhada em um papel filtro e recortada, e em seguida este foi passado em aparelho que mede a área foliar (Li- Cor- L1- 3100C).

Para a obtenção dos parâmetros de crescimento *in vitro* NF, NR, CA e CR foram utilizadas 13 repetições por tratamento (cada repetição continha 4 plântulas) totalizando 52 plântulas por tratamento. Para a área foliar foram utilizadas 5 plântulas por tratamento.

### 2.2.3 Análises fisiológicas

Ao final dos 90 dias de crescimento *in vitro* foram realizadas análises da eficiência fotossintética por meio de medidas da fluorescência da clorofila *a* utilizando-se o fluorômetro de excitação contínua Handy-PEA (Hansatech, UK) de acordo com as recomendações de Strasser et al. (2004).

Previamente às leituras, as folhas foram adaptadas ao escuro utilizando-se clips foliares por 30 minutos, período para oxidação completa do sistema fotossintético. Em seguida foi emitido um flash de luz, proporcionando um pulso de irradiância saturante de  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons nas folhas, com duração de 1s. A intensidade da fluorescência foi medida em 50, 100, 300  $\mu\text{s}$ , 2, 30 s e a 1s. A partir da fluorescência transiente OJIP foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP. A interpretação e normalizações dos parâmetros medidos e calculados a partir deste teste foram de acordo com Strasser e Strasser (1995).

Para as análises referentes à fluorescência da clorofila *a* adotou-se um delineamento inteiramente casualizado para os cinco tratamentos, sendo as medições realizada em 8 plantas por tratamento.

### 2.2.4 Análise estatística

Os dados referentes à porcentagem de germinação, ao índice de velocidade de germinação, ao Tempo médio de germinação, aos parâmetros de crescimento e à fluorescência da clorofila *a* (Teste JIP) foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR 5.4 (FERREIRA, 2011).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Germinação e crescimento *in vitro*

De acordo com os resultados da ANOVA (Tabela 1), houve diferença significativa apenas para os parâmetros IVG, TMG e área foliar (AF). O coeficiente de variação (CV) variou entre 21,59 a 37,36%.

**Tabela1:** Resumo da Análise de Variância para os parâmetros Porcentagem de germinação (%G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Tempo médio de germinação (TMG), Área foliar (AF), Comprimento aéreo (CA), Comprimento radicular (CR), Número de folhas (NF), Número de raiz (NR), de *B. antiacantha* cultivadas *in vitro* por 90 dias em diferentes concentrações do meio MS (Murashige e Skoog, 1962)

FV	GL	Quadrado Médio							
		%G	IVG	TMG	AF	CA	CR	NF	NR
Meio de cultivo	4	783.653 <sup>ns</sup>	0.013 <sup>**</sup>	9688.638 <sup>**</sup>	38.859 <sup>*</sup>	3.067 <sup>ns</sup>	4.538 <sup>ns</sup>	0.604 <sup>ns</sup>	7.962 <sup>ns</sup>
Resíduo	60	342.948	0.001	1123.489	12.902	1.988	2.250	0.479	10.489
Total	64								
CV (%)		21,59	27,76	31,49	31,21	32,48	34,47	23,46	37,36

\*, \*\* significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de Tukey, ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV - Coeficiente de variação.

O maior valor do IVG (0,17) foi obtido no meio MS 0%. O TMG foi menor no meio MS 0%, diferindo significativamente dos meios MS 50%, 75% e 100% (Tabela 2). Para a AF, não houve diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 2).

**Tabela 2:** Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo Médio de Germinação (TMG) de sementes e Área foliar (AF) de plântulas de *B. antiacantha* cultivadas *in vitro* por 90 dias em diferentes concentrações do meio MS (Murashige e Skoog, 1962)

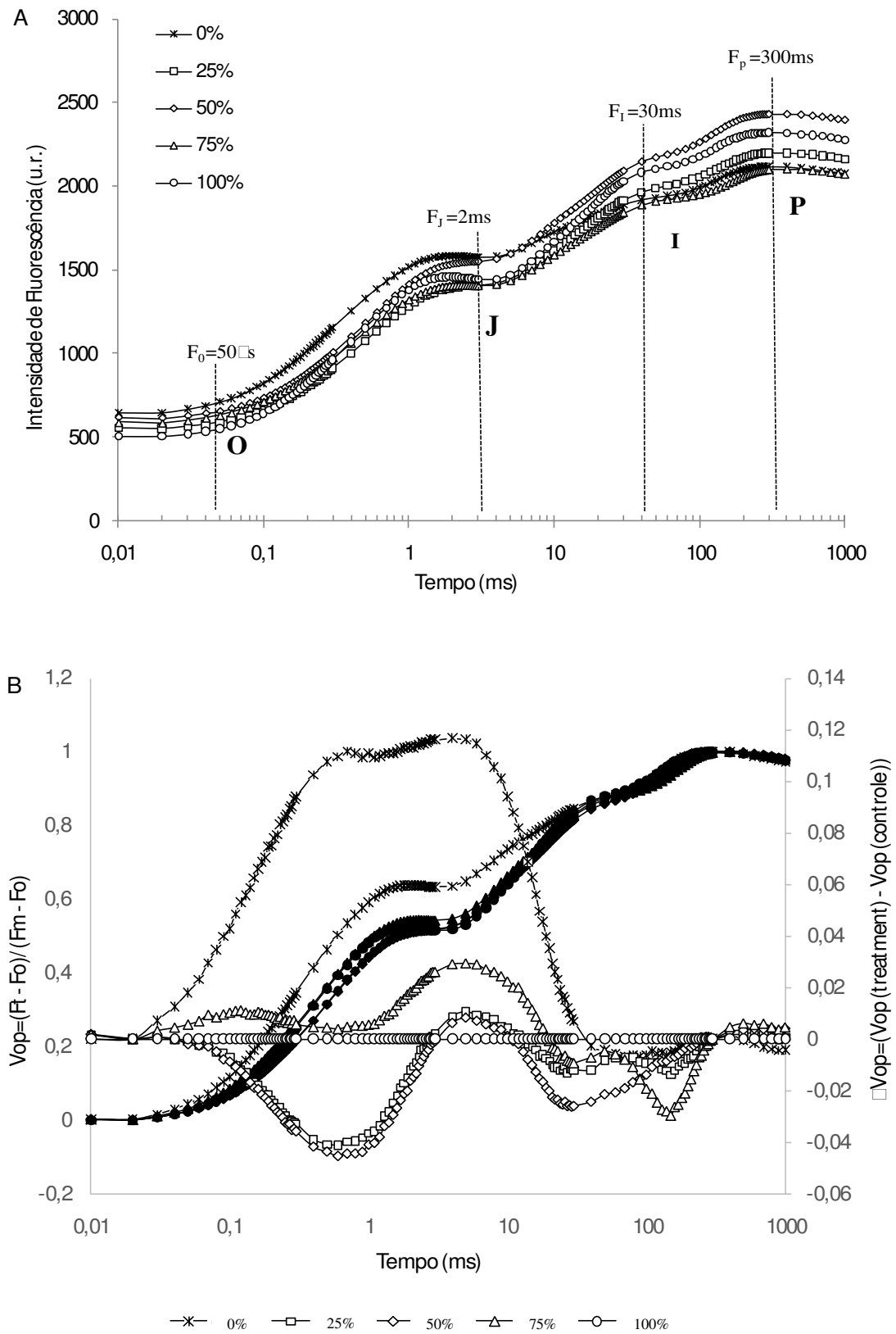
Tratamentos (concentrações do meio MS)	IVG	TMG	AF
100%	0.10 b ± 0,02	128.76 a ± 10,9	12.39 a ± 1,4
75%	0.09 b ± 0,02	134.30 a ± 34,9	11.55 a ± 3,9
50%	0.10 b ± 0,04	109.92 ab ± 40,9	13.37 a ± 3,7
25%	0.11 b ± 0,03	90.76 bc ± 40	13.49 a ± 3,6
0%	0.17 a ± 0,02	68.38 c ± 31,5	6.72 a ± 4,3

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.2 Fluorescência da clorofila *a*

As curvas polifásicas OJIP das plantas, após 90 dias de cultivo *in vitro*, foram apresentadas em escala logarítmica, no intervalo entre 10  $\mu$ s para 1 s em relação a intensidade da fluorescência da clorofila *a* (Ft) (Figura 1A). Para todas as amostras, observou-se um comportamento típico polifásico com aumento da magnitude dos sinais de fluorescência desde um nível basal (denominado  $F_0$ ) até um nível máximo (denominado  $F_m$ ) com os pontos intermediários J e I bem definidos. Estes pontos evidenciaram três fases distintas (O-J, J-I e I-P) (Figura 1A). Na fase O-J, nota-se um incremento das fases em todos os tratamentos, sendo mais pronunciado no tratamento com o meio MS 0%. A partir da fase J-I, a curva de MS 0% começa a decrescer.

A fluorescência relativa variável entre os pontos O e P ( $V_{OP}$ ) foi menor em plantas com alta concentração do meio MS e maior em plantas do meio MS 0% (Figura 1B). As curvas de diferenças cinéticas da fluorescência transiente relativa para o controle [ $\Delta V_{OP}(\text{tratamento}) - V_{OP}(\text{controle})$ ] mostram a presença de bandas negativas nas fases O-J e J-I (Figura 1B) nos tratamentos MS 25 % e 50 %. Praticamente nenhuma variação do parâmetro  $\Delta V_{OP}$  foi observada para o meio MS 75% em relação ao controle (MS 100%). Enquanto que o meio MS 0% foi o único que apresentou bandas positivas mais pronunciadas.

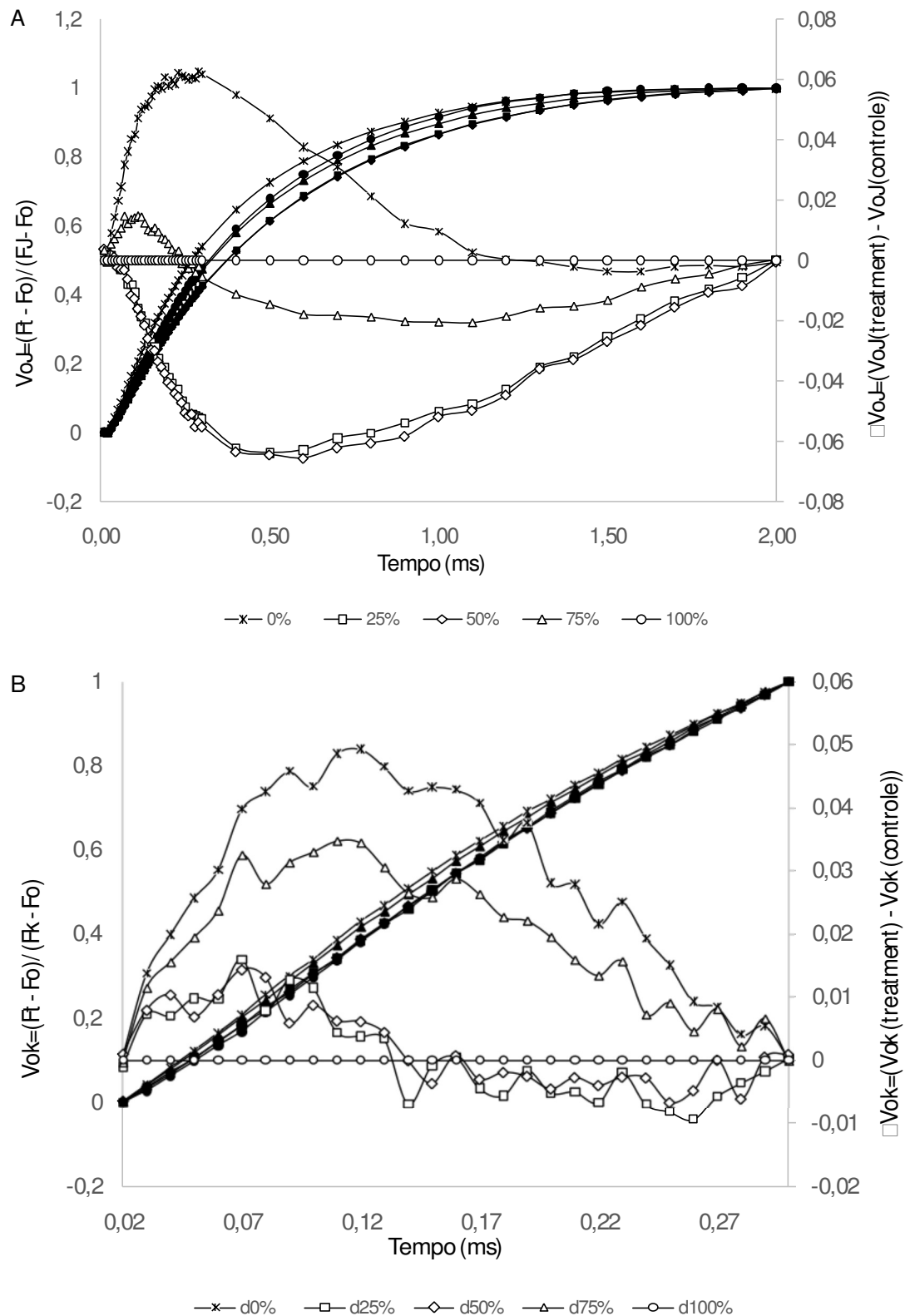


**Figura 1.** Fluorescência transitente da clorofila *a* de O a P após dupla normalização entre os passos  $F_0$  e  $F_p$  de *Bromelia antiacantha*. (A) Intensidade da fluorescência ( $F_t$ ); (B) Fluorescência variável relativa [ $V_{OP} = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$ ] apresentado com os símbolos preenchidos de preto e Diferença cinética de  $V_{OP}$  [ $\Delta V_{OP}[\text{tratamento}] - V_{OP}[\text{controle}]$ ] apresentado com os símbolos sem preenchimento.



A fluorescência relativa entre o ponto O (50  $\mu$ s) e J (2 ms) [ $V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ ] foram normalizados e são mostrados como diferenças cinéticas [ $\Delta V_{OJ} = (V_{OJ}(\text{tratamento}) - V_{OJ}(\text{controle}))$ ] (Figura 2A), revelando a banda K. A banda K aparece em aproximadamente 0,3 ms. Alterações na fase O-J com diferentes amplitudes de banda K ocorreram em todas as plantas, independente da concentração do meio MS (Figura 2A). Banda K com amplitude positiva foi observada em plantas cultivadas no meio MS 0. Por outro lado, bandas K negativas foram observadas nos demais tratamentos, sendo mais pronunciadas nas plantas cultivadas nos meios MS 25% e MS 50% (Figura 2A).

A fluorescência relativa entre o passo O (50  $\mu$ s) e K (300  $\mu$ s) [ $V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ ] foi normalizada e é apresentada como diferença cinética  $\Delta V_{OK}$  [ $\Delta V_{OK} = V_{OK}(\text{tratamento}) - V_{OK}(\text{controle})$ ] ou banda L (Figura 2B). As bandas L aparecem em aproximadamente 0,15 ms. Bandas L positivas foram observadas para todos os tratamentos. Entretanto, as plantas cultivadas no meio MS 0 apresentaram bandas L com amplitude mais positiva comparativamente aos demais tratamentos. Por outro lado, para o tratamento do meio MS 25%, observou-se bandas L negativas após 0,1s.



**Figura 2.** Fluorescência transiente da clorofila de O a K e O a J após dupla normalização entre os passos  $F_0$  e  $F_K$  de *Bromelia antiacantha*. (A) Fluorescência variável entre os passos O e K [ $V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ ] apresentado com os símbolos preenchidos de preto e Diferença cinética de  $V_{OK}$  [ $\Delta V_{OK} = V_{OK}(\text{tratamento}) - V_{OK}(\text{controle})$ ] apresentado com os símbolos sem preenchimento; (B) Fluorescência variável entre os passos O a J [ $V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ ] apresentado com os símbolos preenchidos de preto e Diferença cinética de  $V_{OJ}$  [ $\Delta V_{OJ} = (V_{OJ}(\text{tratamento}) - V_{OJ}(\text{controle}))$ ] apresentado com os símbolos sem preenchimento.

De acordo com os resultados da ANOVA dos parâmetros do teste JIP (Tabela 3) analisados, houve diferença significativa para  $F_0$ ,  $F_v/F_m$ ,  $ABS/RC$ ,  $TR_0/RC$ ,  $ET_0/RC$ ,  $DI_0/RC$ ,  $RC/CS_0$ ,  $PI_{(ABS)total}$ .

**Tabela 3:** Resumo da Análise de Variância para os parâmetros,  $F_0$  = Fluorescência inicial ou mínima;  $F_v/F_m$  = Eficiência fotoquímica máxima do FSII;  $ABS/RC$  = Fluxo de absorção de energia por centro de reação;  $TR_0/RC$  = Fluxo de energia capturada por centro de reação no  $t=0$ ;  $ET_0/RC$  = Fluxo de transporte de energia por centro de reação no  $t=0$ ;  $DI_0/RC$  = Fluxo de energia dissipada por centro de reação no  $t=0$ ;  $RC/CS_0$  = Quantidade de centros de reação do FSII ativos por seções cruzadas (CS) em  $t=0$ ;  $PI_{(ABS)total}$  = Índice de desempenho total, medindo a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI;  $Sm/TF_{max}$  = fração média de CR abertos no período de tempo de 0 a  $TF_{max}$  (tempo de produção da fluorescência máxima), de *B. antiacantha* cultivadas *in vitro* por 90 dias em diferentes concentrações do meio MS (Murashige e Skoog, 1962)

FV	GL	Quadrado Médio								
		$F_0$	$F_v/F_m$	$ABS/RC$	$TR_0/RC$	$ET_0/RC$	$DI_0/RC$	$RC/CS_0$	$PI_{(ABS)total}$	$Sm/TF_{max}$
Meio de cultivo	4	40872.100*	0.0165**	1.879**	0.365**	0.009*	0.633**	6492.038**	16.150**	0.00008 <sup>ns</sup>
Resíduo	20	10780.180	0.0009	0.036	0.012	0.003	0.018	1132.602	1.692	0.00022
Total	24									
CV (%)		19,59	4,34	7,64	6,25	7,16	18,72	13,46	32,37	20,01

\*, \*\* significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de Tukey, ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV - Coeficiente de variação.

Os resultados dos parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* deduzidos a partir da análise do teste JIP de *B. antiacantha* são apresentados na tabela 4. Para os meios MS 100% e 75%, foram observados os menores valores de  $F_0$  (463.4 e 465.2, respectivamente) nas plantas analisadas, embora diferenças ( $p \leq 0,05$ ) tenham ocorrido apenas com o meio MS 0%.

Os valores da eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $\Phi P_0 = F_v/F_m = TR_0/ABS = \Phi_{Hi}/P_0$ ) foram menores para o meio MS 0% (0.622) e diferiu ( $p \leq 0,05$ ) dos demais tratamentos (Tabela 5).

**Tabela 4:** Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* deduzidos a partir da análise do teste JIP de *B. antiacantha* cultivadas *in vitro* por 90 dias em diferentes concentrações do meio MS (0%, 25%, 50%, 75% e 100%)

Tratamentos (concentrações do meio MS)	F <sub>0</sub>	F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	ABS/RC	TR <sub>0</sub> /RC	ET <sub>0</sub> /RC	DI <sub>0</sub> /RC	RC/CS <sub>0</sub>	PI <sub>(ABS)total</sub>	Sm/T <sub>Fmax</sub>
100%	463.400 b	0.764 a	2.480 b	1.868 B	0.888 a	0.610 b	225.848 b	4.240 a	0.070 a
75%	465.200 b	0.732 a	2.306 bc	1.680 bc	0.790 a	0.624 b	232.376 b	3.796 a	0.074 a
50%	578.200 ab	0.744 a	2.186 bc	1.620 c	0.804 a	0.566 b	304.396 ab	4.928 a	0.080 a
25%	476.000 ab	0.752 a	2.028 c	1.524 c	0.788 a	0.502 b	268.920 ab	5.974 a	0.078 a
0%	667.200 a	0.622 b	3.570 a	2.208 a	0.780 a	1.364 a	218.650 b	1.160 b	0.072 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, em cada parâmetro, não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. F<sub>0</sub> = Fluorescência inicial ou mínima; F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> = Eficiência fotoquímica máxima do FSII; ABS/RC = Fluxo de absorção de energia por centro de reação; TR<sub>0</sub>/RC = Fluxo de energia capturada por centro de reação no t=0; ET<sub>0</sub>/RC = Fluxo de transporte de energia por centro de reação no t=0; DI<sub>0</sub>/RC = Fluxo de energia dissipada por centro de reação no t=0; RC/CS<sub>0</sub> = Quantidade de centros de reação do FSII ativos por seções cruzadas (CS) em t=0; PI<sub>(ABS)total</sub> = Índice de desempenho total, medindo a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI; Sm/T<sub>Fmax</sub> = fração média de CR abertos no período de tempo de 0 a T<sub>Fmax</sub> (tempo de produção da fluorescência máxima).

De maneira geral, os valores dos fluxos específicos de energia por centro de reação, especificamente ABS/RC, TR<sub>0</sub>/RC e DI<sub>0</sub>/RC, aumentaram com a redução da concentração do meio de cultura (Tabela 4). Para o fluxo de transporte de energia por centro de reação (ET<sub>0</sub>/RC) e a densidade de centro de reação por seção transversal (RC/CS<sub>0</sub>) não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos.

O índice de desempenho fotoquímico [PI<sub>(ABS)total</sub>] teve seu menor resultado no meio MS 0% (1.160), o qual diferiu dos demais tratamentos.

O Sm/T<sub>Fmax</sub> (fração média de CR abertos no período de tempo de 0 a T<sub>Fmax</sub> (tempo de produção da fluorescência máxima) não diferiu entre as diferentes concentrações do meio MS.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Germinação e crescimento *in vitro*

Analisando o resumo da ANOVA (Tabela 1) observa-se que os valores dos CV oscilaram entre 21,59 a 37,36%. Steel et al. (1997) salientam que o CV permite quantificar a precisão das pesquisas por meio da comparação dos resultados de diferentes experimentos envolvendo uma mesma variável resposta ou espécie. Também enfatizam que o CV varia de acordo com a espécie e a variável resposta estudada, sendo que o pesquisador deve estar atento a esses valores de acordo com a sua área de atuação. Geralmente, para experimentação agrícola compara-se o CV com aqueles sugeridos por Pimentel Gomes (2009). Entretanto, os experimentos de cultivo *in vitro* de plantas podem apresentar baixa precisão devido a várias causas como a variabilidade do material genético, o genótipo, o tipo do explante e as características químicas e físicas do meio de cultivo (WERNER et al., 2012). Para este experimento, o CV foi comparado com os sugeridos por Werner et al. (2012) que consideram os coeficientes de variação como baixos, quando são inferiores à 6,44%; médios, quando estão entre 6,44 e 36,96%; altos, quando estão entre 36,96 e 52,22% e muito alto, quando são superiores à 52,22%. Portanto, observa-se que a maioria dos CV encontrados está dentro da faixa dos valores médios.

Em relação aos meios de cultivo, vários estudos mostram o efeito de diferentes concentrações do meio MS para bromeliáceas. Os resultados mostram que as diferentes concentrações interferem na taxa de germinação e tem um comportamento diferencial para cada espécie. Em *Nidularium minutum* Mez a maior porcentagem de germinação foi no meio MS 50% (KURITA et al. 2014) e em *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms em meios acima de 75% (NAVES, 2001).

Outros trabalhos com espécies não pertencentes a família Bromeliaceae também foram realizados testando diferentes diluições do meio MS como, arnica (*Lychnophora pinaster*) (SOUZA, 2003), murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) (NOGUEIRA et al., 2004), erva-cidreira (*Melissa officinalis*) (REIS et al., 2008). Os autores verificaram, que concentrações de MS 25%, para *L. pinaster* e *M. officinalis* e 50% para *B. intermedia* forneceram os melhores resultados quanto ao aumento da porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação e que o MS completo (MS 100%), juntamente com a sacarose, afetou o balanço osmótico, prejudicando o processo germinativo.

Segundo George (1993), a diminuição da porcentagem de germinação com o aumento da concentração de sais no meio é decorrente da regulação osmótica do meio de cultura, visto que concentrações elevadas de sais fazem com que o meio de cultura não possua água disponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início do processo de germinação. Isso poderia justificar a maior porcentagem de germinação em meio MS 0% observada no presente trabalho.

Em relação ao IVG, o maior valor foi observado no meio MS 0%, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 2). Resultados diferentes são encontrados na literatura como no estudo de Naves (2001) que encontrou os maiores valores de IVG para *A. imperialis* (Carriere) Harms em concentrações superiores a 75% do meio MS. Em *Melissa officinalis* os maiores valores de IVG foram observados no meio MS 25% e MS 50% (REIS et al., 2008).

A semente já possui em sua reserva nutritiva um teor de sacarose que lhe permite a emissão da plúmula e da radícula (REIS et al., 2008). Isso poderia justificar o fato do maior valor de G% e IVG ter sido observado no meio apenas com ágar e água.

Em relação ao TMG o menor resultado foi obtido no meio MS 0%, que não diferiu do meio MS 25%, mas diferiu dos meios MS 50%, 75% e 100% (Tabela 2), indicando serem os tratamentos nos quais as sementes germinaram em menor tempo. Este fato é importante, pois permite a otimização do tempo, permitindo a obtenção de um número maior de plântulas em um tempo reduzido (MERCIER; KERBAUY, 1997).

A adição de componentes ao meio de cultivo, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representa um decréscimo considerável no potencial osmótico do meio e interfere, conseqüentemente, na disponibilidade de água para o processo de embebição da semente na germinação (GEORGE, 1993). Isso poderia explicar os resultados observados para o IVG e o TMG, onde o meio com ausência de nutrientes (MS 0%) apresentou os maiores resultados de IVG (0,17), bem como o menor valor de TMG (68,38), seguido pelo meio MS 25% (Tabela 2).

A redução na concentração de sais do meio MS para o estabelecimento *in vitro* de *B. antiacantha* se mostrou vantajoso por diminuir o tempo de germinação e conseqüentemente o custo da produção, visto que os melhores meios foram mais diluído em relação ao MS completo.

Outros trabalhos na literatura testam o efeito das diferentes concentrações do meio MS nos parâmetros de crescimento e apresentam resultados diferentes ao observado neste estudo (NAVES, 2001; VILLA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007b, 2008; REIS et al., 2008).

Em *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae), observou-se que o comprimento final das plântulas aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração do meio, tendendo a se estabilizar nos valores acima de MS 75% (NAVES, 2001).

Reis et al. (2008), em seu estudo com *M. officinalis*, observaram maior comprimento da parte aérea das plântulas em meio MS 100%, seguido do meio MS 50%. Flôres et al. (2011), avaliando o estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.), observaram maior número de folhas em MS 75%, decrescendo com o aumento de sais no meio de cultivo. Por outro lado, em *Ocimum basilicum* L. e *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng., o maior número de folhas por explante foi alcançado quando o cultivo ocorreu no meio MS 100% (RIBEIRO et al., 2007b, 2008). Villa et al. (2006), em trabalho com *Vitis vinifera*, observaram a maior média do número de folhas em meio MS 50%. A similaridade dos resultados citados demonstra que a concentração de sais do meio MS influencia na formação de folhas, porém, a direção da resposta é específica de cada espécie.

Se por um lado concentrações superiores de nutrientes no meio, embora possam reduzir a germinação de algumas espécies, podem produzir plântulas maiores, mais vigorosas e melhor condicionadas para a aclimatização em condições *ex vitro*, aumentando a reserva energética dos tecidos, importante para as etapas iniciais de aclimatização (REIS et al., 2008).

Por outro lado, diluições do meio MS têm sido utilizadas na micropropagação de bromélias como relatado para *V. hieroglyphica* (MERCIER; KERBAUY, 1994), *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene (TAMAKI et al., 2007), *V. friburgensis* Mez e *V. unilateralis* (Baker) Mez (ARANDA-PEREZ et al., 2009).

Tamaki et al. (2007) trabalhando com *A. comosus* cultivadas *in vitro*, observaram resultados semelhantes em termos de comprimento aéreo, número de folhas, massa fresca e seca quando foram cultivadas nos meios MS 100%, 50% ou 20%. Entretanto, em diluições maiores, houve limitação do desenvolvimento da espécie.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Chaves et al. (2005), os quais afirmam que meios baseados em formulações básicas diluídas têm possibilitado melhores resultados para a multiplicação das mais diversas espécies. Além disso, a diminuição da concentração de sais e de reguladores de crescimento nos meios de cultivo é uma tendência mundial, uma vez que muitas pesquisas estão sendo realizadas com esta finalidade, para que o custo final de produção do explante seja reduzida.

Neste sentido, verifica-se que para a espécie *B. antiacantha*, a diluição do meio MS promoveu melhores resultados quanto à germinação e ao crescimento das plantas *in vitro*, onde diluições do meio MS não prejudicaram o crescimento, mostrando resultados

semelhantes. Este resultado permite que o custo final para a produção de *B. antiacantha* possa ser reduzido, quando se visa a micropropagação da espécie.

#### 4.2 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* em plantas sob diferentes concentrações do meio de cultivo MS apresentou um comportamento polifásico característico OJIP (STRASSER; STRASSER, 1995), mostrando que todas as amostras foram fotossinteticamente ativas (YUSUF et al., 2010). O transiente OJIP mostra a sucessiva redução dos transportadores de elétrons associados aos fotossistemas durante as reações que compreendem a etapa fotoquímica da fotossíntese. A fase O-J, refere-se à redução do lado acceptor do fotossistema II (FSII); a fase J-I evidencia a excitação do FSII até redução do *pool* de plastoquinonas (JOLIOT; JOLIOT, 2002; TÓTH et al., 2007) e a fase I-P, refere-se à transferência dos elétrons para fotossistema I (FSI), especificamente para os aceptores finais como a ferredoxina (Fd) e NADP (YUSUF et al., 2010).

A observação da diferença da fluorescência relativa variável entre  $F_0$  e  $F_m$  ( $\square V_{OP}$ ) evidenciou uma variação acentuada da fluorescência no meio MS 0%, em relação ao controle. Esses resultados indicam que plantas do meio MS 0% sofreram danos nos carregadores de elétrons do intersistema, tendo, portanto, a necessidade de concentrações maiores do meio MS.

O ponto J ocorre aproximadamente a 2 ms e está relacionado com o fechamento parcial de unidades fotossintéticas do centro de reação no FSII (STRASSER et al., 2004; LAZÁR, 2006) (Figura 1A). Sendo assim, esse parâmetro está diretamente envolvido com as mudanças constantes na transferência de elétrons da  $Q_A$  para  $Q_B$  (STRASSER et al., 2010; VREDENBERG, 2000). Essa inflexão no ponto J representa uma dupla redução dos transportadores de elétrons feofitina,  $Q_A$  e  $Q_B$  (STRASSER et al., 2004; LAZÁR, 2006).

Para o ponto I não foram observadas alterações acentuadas. Isso é devido às vias dissipativas distintas que conduzem ao fechamento completo do centro de reação FSII no ponto I no qual as alterações são relacionadas a eventos que ocorrem antes da redução do *pool* de plastoquinonas (BOISVERT et al., 2006).

As análises de fluorescência cinética transiente permitiram a identificação das bandas L e K. Quando as plantas não estão sob condição de estresse, não se verifica desvio positivo nas bandas L e K (TOMEK et al., 2001; OUKARROUM et al., 2007). O aparecimento da banda L é um indicador de conectividade ou agrupamento energético de unidades do FSII



(STRASSER; STIRBET, 1998), que apresenta desvio positivo quando a conectividade é baixa (YUSUF et al., 2010). A alta conectividade resulta na melhor utilização da energia de excitação e melhor estabilidade do sistema (STRASSER et al., 2004). A banda L (150 ns) é influenciada pela transferência de energia entre as unidades independentes do FSII, a qual são denominadas conectividade ou agrupamento (STRASSER; STIRBET, 1998); esse agrupamento é conhecido por ser sensível para o empilhamento ou desempilhamento dos tilacóides.

A presença da banda K (~300 ns) é muito comum sob certos fatores de estresse, especialmente aqueles induzidos por alta temperatura e seca (SRIVASTAVA et al., 1997). A banda K positiva reflete na inativação do complexo de evolução de oxigênio (CEO) e/ou um incremento no tamanho da antena funcional do FSII (YUSUF et al., 2010). Um aumento da banda K pode ser por um desequilíbrio entre o doador de elétrons e lados aceptores do FSII (STRASSER, 1997), a qual são ligados para a dissociação do complexo de evolução do oxigênio que usa manganês (Mn) como um cofator essencial na oxidação da água. Assim, o aparecimento da banda K pode ser relatado para um baixo conteúdo de manganês nas folhas.

Embora bandas L positivas apareçam em todos os tratamentos, suas amplitudes foram altas em plantas cultivadas em meio MS 0% e MS 75%. Assim, o efeito da ausência de nutrientes e de nutrientes em excesso pode ser associado com uma redução da conectividade ou agrupamento entre as unidades ativas do FSII ou para a desorganização da membrana estrutural dos tilacóides (STRASSER; STIRBET, 1998), o que pode diminuir a estabilidade das subunidades do FSII causando distúrbios na conectividade energética (CHEN; CHENG, 2010). A banda L positiva pode aparecer em plantas sob déficit hídrico, o que sugere que o sistema fotossintético aumentou a dissipação para melhorar a utilização da energia de excitação. Por outro lado o tratamento do meio MS 25% apresentou bandas L negativas após 0,1s, demonstrando uma melhor utilização da energia de excitação e melhor estabilidade do sistema.

O aparecimento da banda K positiva nas plantas cultivadas em meio MS 0% e MS 75%, indica uma inativação do complexo de evolução de oxigênio (CEO) e/ou um incremento no tamanho da antena funcional do FSII (YUSUF et al., 2010). Quanto maior a amplitude dessa banda, maior é a inativação do complexo de evolução de oxigênio (ADAMSKI et al., 2011). Assim, pode ser assumido a presença da banda K positiva como um resultado da ausência ou da alta concentração do meio MS. No entanto, bandas K negativas nas plantas cultivadas em meio MS 25% e 50% sugerem a manutenção da atividade do complexo de evolução de oxigênio.

Uma maior amplitude das bandas L e K em plantas cultivadas sem nutrientes e em alta concentração de nutrientes sugerem que a funcionalidade do FSII mudou devido a alta ou ausência de concentração de nutrientes no meio, o que afeta de forma prejudicial o aparato fotossintético. Enquanto que as concentrações intermediárias que foram de 25% e 50% do meio MS mostraram bons resultados para a funcionalidade do aparato fotossintético, sugerindo maior habilidade em manter a atividade do CEO e a estabilidade energética do FSII.

Houve aumento da fluorescência inicial ( $F_0$ ) nas plantas cultivadas em meio MS 0%. O aumento de  $F_0$  está relacionado com a diminuição da taxa de energia capturada pelo FSII e pode ser atribuído à diminuição do número de CR ativos causada pela menor transferência de energia dos complexos coletores de luz do FSII (LHCII) para os CR's. Esse comportamento é uma consequência da dissociação do complexo LHCII do núcleo do FSII ou da inativação do complexo de evolução do oxigênio (YAMANE et al., 1997; LIN et al., 2009; GHOTBI-RAVANDI et al., 2014). Os resultados obtidos para banda K e banda L, sugerem que o aumento na intensidade da fluorescência observado em  $F_0$  pode ser atribuído tanto à inativação do CEO como também à diminuição da conectividade energética entre as subunidades do FSII. Esse aumento em  $F_0$  tem sido documentado como um dos sinais mais diretos de fotoinibição em plantas (ARO et al., 1993). Por outro lado, decréscimos em  $F_0$  representam a reativação do centro de reação FSII foto-danificado ou inativado (DIAS; MARENCO, 2006).

Além disso, o aumento de  $F_0$  juntamente com o decréscimo de  $F_m$  causaram a diminuição de  $F_v/F_m$  no meio MS 0%. A diminuição de  $F_v/F_m$  durante uma condição de estresse é considerado como indicador de danos no FSII (BAKER; ROSENQVIST, 2004; LIN et al., 2009). No entanto, a fotoinibição observada pode ser considerada como uma adaptação positiva causada pela regulação dos mecanismos fotoquímicos e pelos mecanismos fotoprotetores como a dissipação energética não fotoquímica, transição de estado, fluxo cíclico de elétrons ao redor do FSI ou ainda o ciclo água-água (MUNEKAGE et al., 2004; MIYAKE, 2010; ROCHAIX, 2011; KEREN; KRIEGER-LISZKAY, 2011; RAVEN, 2011; DUFFY et al., 2013). Tais mecanismos previnem a super-redução da cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese e diminuem a potencialidade de eventuais danos causados pelo estresse oxidativo (CARVALHO, 2008; NISHIYAMA et al., 2011; KALAJI et al., 2011; CAMPOS et al., 2014).

Em relação aos parâmetros relacionados aos fluxos específicos de energia, o fluxo de absorção (ABS/RC), o fluxo de energia capturada pelo centro de reação ( $TR_0/RC$ ) e o fluxo

de energia dissipada por centro de reação ativo ( $DI_0/RC$ ) tiveram valores maiores nas plantas cultivadas no meio MS 0. Enquanto o fluxo de transporte de energia ( $ET_0/RC$ ) não apresentou diferença significativa.

Esse incremento de  $ABS/RC$  e  $TR_0/RC$  complementado pelo aumento de  $DI_0/RC$  sugere um mecanismo de fotoproteção das plantas e também foi observado em *Solanum nigrum* L. durante a aclimatização (SWAIN et al., 2010).

A etapa seguinte ao processo de captura de energia ( $TR_0/RC$ ) é o fluxo de transporte desta energia por CR ( $ET_0/RC$ ). O fluxo de transporte de energia representa a taxa de reoxidação de  $QA^-$  e o seu aumento indica que houve aproveitamento da energia luminosa combinada com menor taxa de dissipação de energia ( $DI_0/RC$ ) (STRASSER et al., 2004). No presente experimento  $ET_0/RC$  não apresentou diferença significativa. Menores valores de  $DI_0/RC$  foram verificados nos tratamentos 25%, 50%, 75% e 100%. Portanto o aproveitamento de energia luminosa ocorreu neste tratamento. Enquanto maior valor de  $DI_0/RC$  foi verificado no meio MS 0%.

De acordo com o observado para os valores  $DI_0/RC$ , a energia proveniente das elevações de  $ABS/RC$  e  $TR_0/RC$  que não está seguindo para o fluxo de transporte de energia ( $ET_0/RC$ ), passa, então, a ser dissipada na forma de calor ( $DI_0/RC$ ) (ÖQUIST et al., 1992; STRASSER et al., 2004; DEMETRIUS et al., 2007). O aumento no fluxo de energia dissipada por CR ( $DI_0/RC$ ) observado no meio MS 0%, que diferiu dos demais, sugere a atuação de um mecanismo de dissipação de energia em resposta a redução da assimilação de  $CO_2$ . Resultado semelhante foi encontrado por Martinazzo et al., (2011) ao avaliar a atividade fotossintética em pêssegos híbridos submetidos ao déficit hídrico e alagamento. Esses autores argumentam que a diminuição do fluxo de energia na cadeia transportadora de elétrons em resposta à menor disponibilidade de  $CO_2$  para as reações bioquímicas da fotossíntese é um mecanismo que regula o estresse oxidativo e previne a fotoinibição crônica.

O índice de desempenho total medindo a performance até os aceptores de elétrons do FSI ( $PI_{(ABS)total}$ ) é um indicador de vitalidade da planta e tem sido considerado como um parâmetro mais sensível para a detecção de estresses nos vegetais (CHRISTEN et al., 2007; OUKARROUM et al., 2007; YUSUF et al., 2010), pois incorpora em seu cálculo parâmetros relacionados com a conservação de energia de fótons absorvidos pelo FSII (ABS), captura da energia de excitação (TR) e conversão da energia de excitação para o transporte de elétrons para o intersistema (ET) e a redução dos aceptores finais do FSI (RE) (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008). Este parâmetro não responde apenas às perdas na atividade do FSII, mas também a danos relativos ao FSI (XIANG et al., 2013). Assim, valor menor de  $PI_{(ABS)total}$

verificado nas plantas cultivadas no meio MS 0% pode causar perda da estrutura e função do FSI, resultando na inibição da doação de elétrons e redução dos aceptores finais do FSI, com consequente contribuição nas reduções de  $PI_{(ABS)total}$ .

O  $PI_{(ABS)total}$  é um parâmetro que responde à cinética da fluorescência entre os dois extremos  $F_0$  e  $F_m$ , assim, seu cálculo considera todas as etapas da fluorescência transiente O-J-I-P (VAN HEERDEN et al., 2007). Deste modo, a diminuição de  $F_v/F_m$  é esperada apenas em situações de estresse hídrico severo, conforme pôde ser observado no meio MS 0%.

Quanto a quantidade de centros de reação do FSII ativos ( $RC/CS_0$ ) não apresentou diferença significativa entre as diferentes concentrações do meio MS. Os centros de reação ativos permitem maior fluxo de energia capturado pelo FSII e, portanto maior eficiência fotossintética (ARO et al., 1993).

Esses resultados indicam que plantas do meio MS 0% sofreram danos no aparato fotossintético como, a inativação do CEO e a diminuição da conectividade energética entre as subunidades do FSII. Além disso, os resultados sugerem que as plantas deste meio sofreram com fotoinibição. Por outro lado, plantas do meio MS 25% demonstraram uma melhor funcionalidade do aparato fotossintético, tanto na análise das curvas OJIP quanto no teste JIP.

## 5. CONCLUSÃO

As diferentes concentrações de sais do meio MS não afetaram significativamente a porcentagem de germinação e os parâmetros de crescimento, mas influenciaram o índice de velocidade de germinação e o tempo médio de germinação. Estes últimos tiveram os melhores resultados no meio MS 0% e MS 25%.

Para os parâmetros de crescimento *in vitro* não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações do meio MS.

Uma maior amplitude das bandas L e K em plantas cultivadas em meio MS 0% e MS 75% sugerem que a funcionalidade do FSII mudou devido a alta ou ausência de concentração de nutrientes no meio, o que afeta de forma prejudicial o aparato fotossintético.

Declínios observados em  $F_v/F_m$  e  $PI_{(ABS)total}$  e elevações em  $F_0$  indicam a ocorrência de fotoinibição nas plantas cultivadas no meio MS 0%.

Incremento de  $ABS/RC$  e  $TR_0/RC$  complementado pelo aumento de  $DI_0/RC$  sugere um mecanismo de fotoproteção das plantas. Aumento esse observado nas plantas cultivadas no meio MS 0%. Os demais tratamentos no geral não diferiram no teste JIP. No entanto, analisando as curvas polifásicas OJIP e o teste JIP, o meio MS 25% foi o que apresentou os melhores resultados quando comparado aos demais meios.

## Referências Bibliográficas

- ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v.168, n.17, p.2056–2062, 2011.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.7, n.4, p.463-472, 2009.
- ARO, E. M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1143, n.2, p.113–134, 1993.
- ASHMORE, S. E. The Status of *in vitro* conservation of tropical and subtropical species. Proceedings of the International Symposium on Biotechnology Tropical & Subtropical Species. **Acta Horticulturae** 461: 477–483. 1998.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004.
- BOISVERT, S.; JOLY, D.; CARPENTIER, R. Quantitative analysis of the experimental O–J–I–P chlorophyll fluorescence induction kinetics. **FEBS Journal**, v.273, n.20, p.4770-4777, 2006.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; ÖQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, v.3, n.4, p.497-514, 1989.
- CAMPOS, H.; TREJO, C.; PEÑA-VALDIVIA, C. B.; GARCIA-NAVA, R.; CONDE-MARTINEZ, F.V.; CRUZ-ORTEGA, M.R. Photosynthetic acclimation to drought stress in *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings is largely dependent on thermal dissipation and enhanced electron flux to photosystem I. **Photosynthesis research**, v. 122, n. 1, p. 23–39, 2014.
- CARVALHO, M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species. **Plant Signal Behav**, v. 3, n. 3, p. 156–165, 2008.
- CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* (L). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.
- CHEN, L. S.; CHENG, L. The acceptor side of photosystem II is damaged more severely than the donor side of photosystem II in “Honeycrisp” apple leaves with zonal chlorosis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 2, p. 253–261, 2010.
- CHRISTEN D., SCHÖNMANN S., JERMINI M., STRASSER R.J., DÉFAGO G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, p.504-514, 2007.

- COSTA NUNES, E. C.; BENSON, E. E.; OLTRAMARI, A. C.; ARAUJO, P. S.; MOSER, J. R.; VIANA, A. M. *In vitro* conservation of *Cedrella fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, 12:837-848. 2003.
- DEMETRIOU, G., NEONAKI, C., NAVAKOUDIS, E., KOTZABASIS, K. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus - the protective role of polyamines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1767, p.272-280, 2007.
- DIAS, D. P.; MARENCO, R. A. Photoinhibition of photosynthesis in *Minuartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. **Photosynthetica**, v.44, n.2, p.235-240, 2006.
- DUFFY, C. D. P.; VALKUNAS, L.; RUBAN, A. V. Light-harvesting processes in the dynamic photosynthetic antenna. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 15, p.18752-70, 2013.
- ELKONIN, L. A.; PAKHOMOVA, N. V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 61:115-123; 2000.
- ENGELMANN, F. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. **Acta Horticulturae** 447: 471-475. 1997.
- ENGELMANN, F. *In vitro* germplasm conservation. **Acta Horticulturae** 461: 41-47. 1998.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FIGUEIREDO, A. M. F.; SAIKI, M.; TICIANELLI, R. B.; DOMINGOS, M.; ALVES, E. S.; MARKERT, B. Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by nêutron activation analysis for environmental biomonitoring. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 249, p. 391-395, 2001.
- FIGUEIREDO, A. M. F.; ALCALA, A. L.; TICIANELLI, R. B.; DOMINGOS, M.; SAIKI, M. The use of *Tillandsia usneoides* L. as bioindicator of air pollution in São Paulo, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 259, p. 59-63, 2004.
- FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R. F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R.B. cont. updated. BROMELIACEAE. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB006414/>). (accessed: 05 April 2016). 2013.
- FLÔRES, A. V.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; PAIM, A.; BASSAN, J. S.; CUNHA, A. C. M. C. M. Estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) em função das concentrações do meio MS. Universidade Federal de Lavras, Brasil. **CERNE**, v. 17, n. 4, pp. 549-553, 2011.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture: part 1 – The technology. 2 ed. **Edington, Exegetics Limited**, 1574p., 1993.

GHOTBI-RAVANDI, A. A.; SHAHBAZI, M.; SHARIATI, M.; MULO, P. Effects of Mild and Severe Drought Stress on Photosynthetic Efficiency in Tolerant and Susceptible Barley (*Hordeum vulgare* L.) Genotypes. **Journal of Agronomy and Crop Science**, p. 403–415, 2014.

GONÇALVES, S., CORREIA, P. J., MARTINS-LOUÇÃO, M. A., and ROMANO, A. A new formulation for *in vitro* rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations. **Biol. Plant.** 49:277–280. 2005.

GONÇALVES, J. F. C.; SILVA, C. E.; GUIMARÃES, D. G.; BERNARDES, R. S. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica**, v.40, n.1, p.89-98, 2010.

GONÇALVES-SOUZA, T.; ALMEIDA, D. F.; ROMERO, G. Q. Bromeliad architectural complexity and vertical distribution predict spider abundance and richness. **Austral Ecology** 36: 476-484. 2011.

GREENWAY, M. B.; PHILLIPS, I. C.; LLOYD, M. N.; HUBSTENBERGER, J. F.; PHILLIPS, G. C. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. **In Vitro Cell. Dev Biol-Plant.** 48(4):403–410. 2012.

HASEGAWA, P. M. *In vitro* propagation of rose. **HortScience**, v. 14, p. 610-612, 1979.

HERMANS, C.; SMEYERS, M.; RODRIGUEZ, R. M.; EYLETTERS, M.; STRASSER, R. J.; DELHAYE, J-P. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.81-90, 2003.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., Eds., Handbook of Plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: **Mac-millan**, p. 117-227, 1983.

JOLIOT, P., JOLIOT, A. Cyclic electron transfer in plant leaf. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.15, p.10209-10214, 2002.

KALAJI, H. M.; BOSA, K.; KOŚCIELNIAK, J.; ŻUK-GOŁASZEWSKA, K. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 64–72, 2011.

KEREN, N.; KRIEGER-LISZKAY, A. Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance. **Physiologia plantarum**, v. 142, n. 1, p. 1–5, 2011.

KRAUS, J.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. **Seropédica** (RJ): Ed. Universidade Rural, 96 p. 1997.



KURITA, F. M. K.; MACHADO, B. M.; TEIXEIRA, N. B.; CÉSAR, C. G. A.; NIEVOLA, C. C. TAMAKI, V. Fenologia, cultivo *in vitro* e aclimatização da bromélia ameaçada de extinção *Nidularium minutum* Mez. **Biotemas**, 27 (1): 59-69, 2014.

LAZÁR, D. The Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. **Functional Plant Biology**. v. 33, n.1, p.9-30, 2006.

LELJAK-LEVANIĆ, D.; BAUER, N.; MIHALJEVIĆ, S.; JELASKA, S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. **J. Plant Physiol.** 161: 229–236; 2004.

LIN, Z.-H.; CHEN, L.-S.; CHEN, R.-B.; ZANG, F.-Z.; JIANG, H.-X.; TANG, N. CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. **BMC plant biology**, v. 9, p. 43, 2009.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. v.48, n.2, p.263-284, 1976.

LUTHER, H. E. An alphabetical list of bromeliad binomials. Florida: **Bromeliad Society Internacional**, 45 p. 2010.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p. 176-177, 1962.

MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; FARIAS, M. E.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Photosynthetic activity in the rootstock of hybrid peach trees submitted to water restriction and flooding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 3, p. 231–236, 2011.

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

MARTINS, J. P. R.; PASCAL, M.; MARTINS, A. D.; RIBEIRA, S. F. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). **Australian Journal of Crop Science**, 9(1):85-91, 2015.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica* an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal Bromeliad**, 44:120-124, 1994.

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

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In – Biotechnology in Agriculture and Forestry, ed. Bajaj Y.P.S. **Springer-Verlag**, Berlin, Germany, 40 p. 43-57, 1997.

MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, 1(1): 57-62. 2003.

MITTERMEIER, R. A.; GIL, R. P.; HOFFMAN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOUREUX, J.; FONSECA, G. A. B. Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. University of **Chicago Press**, Boston, 392 pp. 2005.

MIYAKE, C. Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions. **Plant & cell physiology**, v. 51, n. 12, p. 1951–63, 2010.

MUNEKAGE, Y.; HASHIMOTO, M.; MIYAKE, C.; TOMIZAWA, K.-I.; ENDO, T.; TASAKA, M.; SHIKANAI, T. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. **Nature**, v. 429, n. 6991, p. 579–82, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497, 1962.

NAVES, V. C. **Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcanterea imperialis* (Carrière) Harms.** Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 76p. 2001.

NEGRELLE, R. R. B.; MITCHELL, D.; ANACLETO, A. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.34, n.1, p.91-100, 2012.

NETO, V. B. P.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, 97:193-202. 2003.

NIEDZ, R. P.; EVENS, T. J. Regulation of plant tissue growth by mineral nutrition. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, 43:370–381. 2007.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; MURATA, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Physiologia Plantarum**, v. 142, n. 1, p. 35–46, 2011.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V. ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

OUKARROUM, A.; EL MADIDI, S.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, n.3, p.438–446, 2007.

ÖQUIST, G.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. **Planta**, v.186, p.450-460, 1992.

- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: Fealq, 2009, 451p.
- PODDAR, K.; VISHNOI, R. K.; KOTHARI, S. L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  as a replacement of NAA in the medium. **Plant Sci.** 129:101–106; 1997.
- POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. **Floresta e Ambiente**, v.12, n.2, p.42-49, 2005.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HAISEL, D.; BAŤKOVÁ, P. Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during *ex vitro* transfer of micropropagated tobacco plantlets. **Biol Plant** 53:11–20. 2009.
- RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cell Dev Biol-Plant**. 38(2):116–124. 2002.
- RAVEN, J. A. The cost of photoinhibition. **Physiologia plantarum**, v. 142, n. 1, p. 87–104, 2011.
- RECH-FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O. LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1799-1808. 2005.
- REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160-167 Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 2008.
- RESENDE, C. F.; RIBEIRO, C.; MENDES, G. C.; SOARES, C. Q. G.; BRAGA, V. F.; CRUZ, B. P.; FORZZA, R. C.; PEIXOTO, P. H. P. *In vitro* culture of *Vriesea cacuminis* L.B. Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 71(1):55-61, 2016.
- RIBEIRO, M. F.; DONINI, L. P.; SOUZA, J. A.; GUISSO, A. P.; FERREIRA-MOURA, I.; BOBROWSKI, V. L.; VIÉGAS, J. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de majoricão roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 57-59, 2007.
- RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, V. A. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 101-106, 2008.
- RIBEIRO, M. C., METZGER, J. P., MARTENSEN, A. C., PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? **Implications for conservation: Biological Conservation** 142: 1141-1153. 2009.

- ROCHAIX, J. D. Regulation of photosynthetic electron transport. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1807, n. 3, p. 375–83, 2011.
- SIVAKUMAR, G.; KIM, S. J.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Optimizing environmental factors for large-scale multiplication of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum grandiflorum*) in balloon-type bioreactor culture. **Cell. Dev. Biol. Plant**, 41:822–825; 2005.
- SOUSA, G. M.; WANDERLEY, M. G. L. *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta botânica brasílica**, v. 14, n. 1, p. 77-97, 2000.
- SOUZA, A. V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica [*Lychnophora pinaster* (Mart.)]**. 2003. 126 p. Dissertação (mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- STANCATO, G. C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M. S. Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe. **Revista Brasileira de Botânica**, 25: 229-235, 2002.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H.; DICKEY, D. A. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York: **McGraw-Hill**. p. 666, 1997.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Stress in plants, from daily rhythm to global changes, detected and quantified by the JIP-test. **Chim Nouv** 75:3321–3326. 2001.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of the Chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 19. **Springer, Dordrecht**, The Netherlands, 321–362. 2004.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration series. **Springer, Dordrecht**, pp 321–362, 2004.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.1797, n.6, p.1313-1326, 2010.
- SWAIN, S. S.; TRIPATHY, T.; MOHAPATRA, P. K.; CHAND, P. K. Photosynthetic and transpiration responses of *in vitro*-regenerated *Solanum nigrum* L. plants to *ex vitro* adaptation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.46, n.2, p.134–141, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ª edição, Porto Alegre: **Artmed**. p. 705, 2006.
- TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, p. 67-73, 2007.

TOMEK, P.; LAZÁR, D.; ILÍK, P.; NAUS, J. On intermediate steps between the O and P steps in chlorophyll a fluorescence rise measure at different intensities of exciting light. **Australian Journal Plant Physiology**, v.28, n.11, p.115-1160, 2001.

TÓTH, S. Z.; SCHANKER, G.; STRASSER, R. J. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP – transient. **Photosynthesis Research**, v.93, n.1, p.193-203, 2007.

THACH, L. B.; SHAPCOTT, A.; SCHMIDT, S.; CRITCHLEY, C. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. **Photosynthesis Research**, v.94, n.2, p.423-436, 2007.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. In vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants. In: A. Varma (Ed.); Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. **Dordrecht: Springer**. p. 679-703, 2008.

VAN-HEERDEN, P. D. R.; SWANEPOEL, J. W.; KRÜGER, G. H. J. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO<sub>2</sub> assimilation. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, n. 2, p. 124–136, 2007.

VAN KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence and other noninvasive spectroscopic techniques in plant stress physiology. **Photosynth Res** 25:146–332. 1990.

VESCO, L. L. D.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v.28, n.4, p.515-522, 2011.

VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R.; PRADO, J. P. C.; WELTER, L. J.; GUERRA, M. P. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 271-278, 2014.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira em variações do meio MS. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 345-349, 2006.

VREDENBERG, W. J. A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in Photosystem II incorporating radical pair recombinations. **Biophysical Journal**, v.79, n.1, p.25-38, 2000.

XIANG M.; CHEN S.; WANG L.; DONGA Z.; HUANGA J.; ZHANGA Y.; STRASSER R. J. Effect of vulculic acid produced by *Nimbya alternantherae* on the photosynthetic apparatus of *Alternanthera philoxeroides*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.65, p.81-88, 2013.

YAMANE, Y.; KASHINO, Y.; KOIKE, H.; SATOH, K. Increases in the fluorescence F<sub>o</sub>(o) level and reversible inhibition of photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. **Photosynthesis Research**, v. 52, p. 57–64, 1997.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI- MICHAEL, M.; GOVINDJEE.; SARIN, N. B. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, p. 1428–1438, 2010.

WERNER, E. T.; MOTTA, L. B.; MARTINS, M. Q.; LIMA, A. B. P.; SCHMILDT, E. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos da cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Cult. Micropropagadas**, v.8, n. 1-2, p. 18-26, 2012.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; SUN, T. Distic cell-specific expression patterns of early and late gibberellins biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. **Plant Journal**. Oxford, v. 28 p. 443-453,2001.

ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. Action of growth regulators. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J., Eds., Tissue culture in forestry. 2. Ed. **Dordrecht**: Martinus Nijhoff, p. 231-255,1985.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, 1995.

### CAPÍTULO III

#### **Influência do silício na fisiologia e anatomia de *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) em condições *in vitro* e *ex vitro***

##### **RESUMO**

Explantos vegetais cultivados *in vitro* apresentam exigências nutricionais específicas que levam à modificações no meio de cultivo conforme a necessidade de cada tipo de tecido e/ou espécie com a qual se esteja trabalhando. A ação benéfica do silício (Si) tem sido associada a diversos efeitos, como aumento da capacidade fotossintética, aumento no teor de clorofila total, redução da transpiração, maior crescimento de plantas e aumento da resistência mecânica das células. A escassez de informações sobre o uso do Si no cultivo de *B. antiacantha* justificou o presente trabalho, que teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de silicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) no crescimento e na fisiologia *in vitro* e *ex vitro* e na anatomia *ex vitro* desta espécie. Plântulas estabelecidas *in vitro* e com cerca de 2,5 cm de altura foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio MS completo, acrescido de sacarose  $30 \text{ g L}^{-1}$  e ágar  $8 \text{ g L}^{-1}$ , contendo cinco concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ : 0; 2,5; 5,0; 10 e  $15 \text{ mg L}^{-1}$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado consistindo de 5 repetições por tratamento (cada repetição continha 5 tubos, com uma planta por tubo). Transcorridos 45 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados os seguintes parâmetros de crescimento: número de folhas (NF) e de raízes (NR), comprimento aéreo (CA) e radicular (CR), área foliar (AF), massa fresca da plântula (MFP) e também realizadas medições de fluorescência da clorofila *a*. Plântulas de todos os 5 tratamentos com  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  foram transferidas para estufa e após 28 dias de cultivo *ex vitro* foram avaliados os mesmos parâmetros de crescimento e retiradas amostras foliares para avaliar as espessuras das epidermes adaxial e abaxial, do clorênquima, do hidrênquima e estimar o número de estômatos. As medições de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de aclimatização. Os dados foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Em relação ao crescimento *in vitro* apenas o parâmetro AF apresentou diferença significativa, com as maiores médias sendo encontradas nas plântulas cultivadas nos meios com 0 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , respectivamente 8.660 e 9.678. Na condição *ex vitro*, apenas o parâmetro CA apresentou diferença significativa, com

as maiores médias encontradas em plântulas cultivadas nas concentrações de 2,5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, respectivamente, 9,318 cm e 9,458 cm, diferindo da concentração de 5 mg L<sup>-1</sup> (7,169 cm). Em relação à fluorescência da clorofila *a*, os parâmetros JIP mostraram efeito de fotoinibição aos 7 e 14 dias, e nas concentrações de 5 mg e 10 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>. *B. antiacantha* apresentam estômatos tetracíticos com distribuição hipoestomática, apresentaram uma camada de células epidérmicas em ambos os lados da folha, parênquima de armazenamento de água (hidrênquima) com células de paredes finas na parte lateral da face adaxial, parênquima clorofiliano (clorênquima) com células isodiamétricas, feixes vasculares colaterais, geralmente feixes maiores alternados com os menores. O mesofilo tem uma organização dorsiventral. A maior densidade estomática foi observada nas folhas de plantas de plantas cultivadas com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> (45,40). A espessura da epiderme adaxial foi maior naquelas cultivadas com 0 e 15 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, ambas com 25,30 μM, diferindo apenas da concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> (20,38 μM).

Palavras-chave: Silicato de sódio; cultivo *in vitro*; cultivo *ex vitro*; fluorescência da clorofila *a*; anatomia foliar



## ABSTRACT

Plant explants *in vitro* cultivated have specific nutritional requirements that lead to changes in the culture medium according to the needs of each type of tissue and / or species with which you are working. The beneficial action of silicon (Si) has been associated with several effects such as increased photosynthetic capacity, increase in the total chlorophyll content, reduction of perspiration, greater plant growth and increasing the mechanical strength of the cells. The scarcity of information on the use of Si in the cultivation of *B. antiacantha* justified the present study, we aimed to evaluate the effect of different concentrations of sodium silicate ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) on growth and physiology *in vitro* and *ex vitro* and anatomy *ex vitro* this species. Seedlings established *in vitro* and with about 2.5 cm were transferred to test tubes containing MS complete medium, supplemented with sucrose 30 g L<sup>-1</sup> and agar 8 g L<sup>-1</sup>  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  containing five concentrations: 0; 2,5; 5,0; 10 e 15 mg L<sup>-1</sup>. The experimental design was completely randomized consisting of 5 replicates per treatment (each repetition contained 5 tubes, with one plant per tube). Elapsed 45 days *in vitro* culture were assessed the following growth parameters: number of leaves (NF) and roots (NR), aerial length (CA) and root (CR), leaf area (AF), fresh weight of seedling (MFP) and also held fluorescence measurements of chlorophyll *a*. Seedlings of all five treatments  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  were transferred to the greenhouse and 28 days after *ex vitro* cultivation were evaluated the same growth parameters and withdrawn leaf samples to measure the thickness of adaxial and abaxial epidermis, of chlorenchyma, of hydrenchyma and estimate the number stomata. Fluorescence measurements of chlorophyll were carried out at 7, 14, 21 and 28 days of acclimatization. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the medium were compared by Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Regarding the growth *in vitro* only the AF parameter showed a significant difference, with the highest average being found in seedlings grown in media with 0 and 10 mg L<sup>-1</sup>  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  respectively 8,660 and 9,678. In the *ex vitro* condition, only the AC parameter showed a significant difference, with the highest average found in cultivating seedlings in concentrations of 2,5 and 10 mg L<sup>-1</sup>  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  respectively 9,318 cm and 9,458 cm, differing from the concentration of 5 mg L<sup>-1</sup> (7,169 cm). Regarding chlorophyll fluorescence, showed the JIP parameter photoinhibition effect at 7 and 14 days and at the concentrations of 5 and 10 mg L<sup>-1</sup>  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . *B. antiacantha* present tetracytic stomata with hypostomatic distribution, had a layer of epidermal cells on both sides of the sheet, water storage parenchyma (hydrenchyma) with thin cell walls on the side of the adaxial surface, chlorophyll parenchyma (chlorenchyma) cells with isodiametrical, collateral vascular bundles, usually larger beams alternated with the

minor. The mesophyll has a dorsiventral organization. The greater stomatal density was observed in the leaves of plants plants grown with  $2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SiO}_3$  (45.40). The adaxial epidermal thickness was higher in plants grown with 0 and  $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SiO}_3$ , both with  $25,30 \text{ }\mu\text{M}$ , differing only in the concentration of  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $20.38 \text{ }\mu\text{M}$ ).

Keywords: Sodium Silicate; *in vitro* culture; *ex vitro* cultivation; chlorophyll *a* fluorescence; leaf anatomy

## 1. INTRODUÇÃO

Técnicas de propagação *in vitro* tem sido usadas para rápida multiplicação de várias espécies vegetais com importância econômica e ameaçadas, tais como diversas espécies pertencentes a família Bromeliaceae (GUERRA; VESCO, 2010).

Condições convencionais de cultivo *in vitro* podem influenciar a anatomia, a fisiologia e a morfologia das plantas, podendo causar perdas ao longo de tratamentos de aclimatização (KITAYA et al., 2005).

O meio de cultivo tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos. Plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas. De acordo com Torres et al. (2001), esses meios podem ser, ainda, modificados conforme a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando.

Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o silício (Si) não tem sido muito estudado na propagação *in vitro*. Acredita-se que ele possa interferir na arquitetura das plantas, proporcionando folhas mais eretas e, com isso, aumentando a eficiência fotossintética das plantas. Contudo, do ponto de vista fisiológico, este elemento tem demonstrado efeito benéfico sobre o aumento de produção de diversas culturas (GOMES et al., 2008).

O Si é um elemento benéfico para o crescimento da planta. Diversas aplicações têm sido relatadas para uma grande variedade de espécies vegetais, tais como aumento da resistência a pragas e patógenos, aumento da tolerância das plantas a estresses ambientais, como frio, calor e seca, resistência mecânica das células, tolerância a toxicidade dos metais pesados na planta e melhoria da qualidade das culturas agrícolas e produtividade (EPSTEIN, 2001; RICHMOND; SUSSMAN, 2003; FAUTEUX et al., 2005; MA; YAMAJI, 2006, 2008; LIANG et al., 2007; RODRIGUES, 2010).

De forma geral, tem sido demonstrado que o Si está relacionado com a melhoria do metabolismo da planta, reduzindo o desequilíbrio de nutrientes em situações de estresses ambientais (EPSTEIN, 2001). Assim, a absorção de Si está relacionada a alguma forma de defesa, seja ela contra estresse biótico ou abiótico (RODRIGUES, 2010). Ele induz uma série de reações metabólicas que resultam na formação de taninos e de outras substâncias químicas como as ligninas (LAING; ADANDONON, 2005), que são importantes componentes na resistência de plantas a patógenos (CHÉRIF; ASSELINE; BÉLANGER, 1994).

Sua ação também está relacionada com o aumento da capacidade fotossintética, aumento no teor de clorofila total, redução da transpiração e maior crescimento das plantas (DEREN et al., 1994; ZHOU, 1995), exercendo, assim, importante papel na estruturação das plantas. Sua presença na parede celular pode elevar os conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina, aumentando a rigidez da célula, características desejáveis, pois eleva as taxas de sobrevivência durante a fase de aclimatização (BARBOSA FILHO et al., 2001).

A ação benéfica do Si já foi relatada em estudos de cultivo *in vitro* de orquídeas (ZHOU, 1995; PASQUAL et al. 2011; SOARES et al., 2011; SOARES et al., 2012), banana (ASMAR et al., 2013) e morangueiro (BRAGA et al. 2009).

Entre os efeitos relatados para o Si está o aumento da capacidade fotossintética (XIA et al., 2004; MEHTA et al., 2010). Entre os diversos métodos disponíveis para a análise do aparato fotossintético, a fluorescência transiente da clorofila *a*, especificamente o teste OJIP, é altamente estudado para investigações *in vitro* (STRAUSS et al., 2003; XIA et al., 2004; THACH et al., 2007; OUKARROUM et al., 2007; KALAJ et al., 2010; MEHTA et al., 2010; STEFANOV et al., 2011). Este teste traduz as mudanças de forma de OJIP para mudanças transientes quantitativas de vários parâmetros, chamados JIP, que são baseados na teoria de fluxo de energia em membranas de tilacóides. Estes parâmetros são a absorção de luz (ABS), captura de energia de excitação (TR) e conversão da energia de excitação para o transporte fotossintético de energia (ET) por centro de reação (CR) ou por amostra de área chamada de secção transversal (CS) (STRASSER et al., 2000; STRASSER et al., 2004; OUKARROUM et al., 2007). O teste OJIP pode ser usado para investigar, ponto por ponto, as frações de mudanças do fotossistema II (FSII), porque mudanças no comportamento do FSII ocorrem quando as plantas são expostas a estresses ambientais. Este teste pode traduzir o estado fisiológico do FSII para parâmetros biofísicos em condições diferentes (STRASSER et al., 2004).

A análise da anatomia foliar de plantas propagadas *in vitro* é de grande importância para estudos comparativos do desenvolvimento de seus tecidos e de estruturas adaptativas, como espessura de cutícula, disposição de células, dimensão e número de estômatos, entre outros. Esses estudos podem servir de base para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento durante a aclimatização, a qual se caracteriza por uma elevada mortalidade, muitas vezes, inviabilizando a micropropagação de algumas espécies (ABBADÉ et al., 2009).

Considerando os benefícios do Si para o cultivo de várias espécies vegetais e a existência de poucos relatos na literatura para a utilização deste elemento no cultivo *in vitro*, especialmente para espécie de bromeliáceas, justifica-se a realização do presente trabalho.

### **Objetivo Geral**

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  no crescimento e fisiologia *in vitro* e *ex vitro* e na anatomia *ex vitro* de *Bromelia antiacantha*.

### **Objetivos específicos**

4. Avaliar o efeito de diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  sobre os parâmetros de crescimento de *B. antiacantha* cultivadas em condições *in vitro* e *ex vitro*;
5. Avaliar o efeito de diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  sobre a eficiência fotossintética das plântulas de *B. antiacantha* estabelecidas *in vitro* e *ex vitro*;
6. Avaliar o efeito de diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  sobre características anatômicas de folhas das plântulas de *B. antiacantha* em condição *ex vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e Laboratório de Ecofisiologia Vegetal na Universidade Federal do Espírito Santo – Centro Universitário Norte do Espírito Santo (UFES- CEUNES).

### 2.1 Material vegetal

Sementes foram retiradas de frutos maduros da espécie *Bromelia antiacantha* Bertoloni coletados em três locais no município de São Mateus – ES: bairro Liberdade, norte de Guriri e sul de Guriri. Em seguida foram lavadas em água corrente para a remoção da mucilagem, secas em papel absorvente, acondicionadas em envelopes de papel e armazenadas em geladeira.

O voucher do espécime-testemunho de *B. antiacantha* foi depositado no Herbário São Mateus Espírito Santo (SAMES) sob o número 01013.

Para a montagem do experimento foi criado um *bulk* de sementes, em que sementes de dois ou mais frutos de cada indivíduo foram misturadas às sementes dos demais indivíduos, a fim de obter uma amostra representativa da diversidade populacional de *B. antiacantha* presente nos locais de coleta.

### 2.2 Cultivo *In vitro*

Sementes de *B. antiacantha* foram submetidas à desinfestação com etanol 70% por cinco minutos, seguida por solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) com três gotas de Tween 20 por cinco minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril.

Posteriormente as sementes foram inoculadas em meio MS completo (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificados com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120° C e 1,2 atm, durante 20 minutos. Após a inoculação das sementes, o material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 25  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , à temperatura de 26  $\pm$  1 °C.

Após 30 dias de crescimento, plântulas com aproximadamente 2,5 cm de parte aérea foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio MS completo acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de

sacarose, 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e cinco concentrações de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>: 0; 2,5; 5,0; 10 e 15 mg L<sup>-1</sup>. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 120°C e 1,2 atm, durante 20 minutos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 25  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , à temperatura de 26  $\pm$  1 ° C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) consistindo de 5 repetições por tratamento (cada repetição continha 5 tubos, com uma planta por tubo).

Transcorridos 45 dias do cultivo foram avaliados os parâmetros de crescimento e realizadas as medições da fluorescência da clorofila *a* descritos abaixo.

### 2.3 Cultivo *Ex vitro*

Após os 45 dias de cultivo *in vitro* e avaliados os parâmetros de crescimento nessas condições, as plantas foram transferidas para bandejas plásticas 53.5 cm x 27.5 cm, cujas 200 células de foram preenchidas com o substrato comercial Tropstrato HT. As plantas foram mantidas em estufa por 28 dias sob nível de luz de aproximadamente 20% (aproximadamente 211,7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  medido pelo Sensor de luz), cobertas com malhas pretas do tipo sombrite.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) consistindo de 3 repetições por tratamento, onde cada repetição continha 3 plantas.

Após 28 dias de cultivo foram avaliados os parâmetros de crescimento, realizadas medições de fluorescência da clorofila *a* e a anatomia foliar.

### 2.4 Análises

#### 2.4.1 Análise de parâmetros de crescimento *in vitro* e *ex vitro*

Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de folhas (NF) e número de raízes (NR); comprimento aéreo (CA) comprimento radicular (CR), ambos em cm; massa fresca da plântula (MFP) em mg e área foliar (AF) em cm<sup>2</sup>.

Os valores de NF e NR foram obtidos por contagem direta das folhas e raízes. A determinação do CA e do CR foi por meio de medição através de régua graduada do comprimento da maior folha e da maior raiz da plântula. A MFP foi obtida por meio da pesagem da plântula inteira. Para determinação da AF, cada folha foi desenhada em um papel filtro e recortada, e em seguida este foi passado em aparelho que mede a área foliar (Li- Cor-L1- 3100C).

Para a obtenção dos parâmetros de crescimento *in vitro* NF, NR, CA, CR e MFP foram utilizadas 5 repetições por tratamento (cada repetição continha 5 plântulas) totalizando 25 plântulas por tratamento. Para a condição *ex vitro* foram utilizadas 3 repetições por tratamento (cada repetição com 3 plântulas) totalizando 9 plântulas por tratamento.

Para a área foliar foram utilizadas 5 plântulas por tratamento da condição *in vitro* e 3 plantas por tratamento da condição *ex vitro*.

#### **2.4.2 Análises fisiológicas *in vitro* e *ex vitro***

Foram realizadas análises da eficiência fotossintética por meio da fluorescência da clorofila *a* utilizando-se o fluorômetro de excitação contínua Handy-PEA (Hansatech, UK) de acordo com as recomendações de Strasser et al. (2004). Foram realizadas medições de fluorescência da clorofila *a* nas plantas *in vitro* e *ex vitro*. As medições *in vitro* foram feitas após 45 dias das plantas nessa condição em 8 plantas por tratamento.

As medições *ex vitro* foram feitas aos 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias, em 3 plantas por tratamento (as cinco diferentes concentrações de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>). O cultivo *ex vitro* das plantas consistiu na permanência destas em estufa sob o nível de luminosidade de aproximadamente 20% (em torno de 211,7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  medido pelo Sensor de luz), utilizando malhas pretas de polietileno, tipo sombrite.

Previamente às leituras, as folhas foram adaptadas ao escuro utilizando-se clips foliares por 30 minutos, período para oxidação completa do sistema fotossintético. Em seguida, foi emitido um flash de luz, proporcionando um pulso de irradiância saturante de 3000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons nas folhas, com duração de 1 s. A intensidade da fluorescência foi medida em 50, 100, 300  $\mu\text{s}$ , 2, 30 ms e a 1 s. A partir da fluorescência transiente OJIP foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP com auxílio do software Biolyzer (Laboratório de Bioenergética, Universidade de Genebra, Suíça). A interpretação e normalizações dos parâmetros medidos e calculados a partir deste teste foram de acordo com Strasser e Strasser (1995).

#### **2.4.3 Análise anatômica *ex vitro***

As análises foram realizadas com 3 plântulas de cada tratamento *ex vitro*, escolhidas ao acaso. As plântulas foram fixadas em solução de F.A.A. (formaldeído, ácido acético e



etanol 50% na proporção de 0,5:0,5:9) por 48 horas, seguido de conservação em etanol 70% (JOHANSEN, 1940).

Secções paradérmicas e transversais foram realizadas na região mediana da primeira folha completamente expandida a partir da roseta das plântulas, com o auxílio de lâmina de barbear. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio 3% (v/v) e posteriormente coradas com safranina (1%), sendo utilizada água destilada para montagem das lâminas (BUKATSCH, 1972).

As secções foram observadas em microscópio óptico (Leica DM5000 B) acoplado à câmera digital para captura de imagens. As fotomicrografias foram utilizadas para as medições das características anatômicas usando o software UTHSCSA-Imagetool® versão 3.0 calibrado com régua microscópica.

Nas secções paradérmicas foi analisado o número de estômatos (estômatos por  $\text{mm}^2$ ). Nas secções transversais foram mensuradas as espessuras da epiderme (face adaxial e abaxial), do parênquima clorofiliano e do parênquima aquífero (valores são dados em  $\mu\text{M}$ ).

## **2.5 Análise estatística**

Os dados referentes aos parâmetros de crescimento, da fluorescência da clorofila *a* e das análises anatômicas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR 5.4 (FERREIRA, 2011).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Parâmetros de crescimento *in vitro* e *ex vitro*

De acordo com os resultados da ANOVA para os parâmetros analisados *in vitro* (Tabela 1), houve diferença significativa apenas para a área foliar (AF). O coeficiente de variação (CV) variou entre 7,51 a 17,80%.

**Tabela 1:** Resumo da Análise de Variância para os parâmetros Comprimento aéreo (CA), Comprimento radicular (CR), Número de folhas (NF), Número de raiz (NR), Massa fresca da plântula (MFP) e Área foliar (AF), de *B. antiacantha* cultivadas *in vitro*

FV	GL	Quadrado Médio					
		CA	CR	NF	NR	MFP	AF
Concentrações Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	4	2.803 <sup>ns</sup>	0.673 <sup>ns</sup>	0.093 <sup>ns</sup>	2.272 <sup>ns</sup>	0.004 <sup>ns</sup>	16.241 <sup>**</sup>
Resíduo	20	1.117	0.707	0.080	1.697	0.004	0.879
Total	24						
CV (%)		15.65	15.03	7.51	15.74	17.80	12.87

\*, \*\* significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de Tukey, ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV - Coeficiente de variação.

Para os resultados da ANOVA dos parâmetros analisados em condição *ex vitro* (Tabela 2), houve diferença significativa apenas para o comprimento aéreo (CA). O coeficiente de variação (CV) variou entre 16,20 a 46,93%.

**Tabela 2:** Resumo da Análise de Variância para os parâmetros Comprimento aéreo (CA), Comprimento radicular (CR), Número de folhas (NF), Número de raiz (NR), Massa fresca da plântula (MFP) e Área foliar (AF), de *B. antiacantha* cultivadas *ex vitro*

FV	GL	Quadrado Médio					
		CA	CR	NF	NR	MFP	AF
Concentrações Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	4	11.189*	1.998 <sup>ns</sup>	0.225 <sup>ns</sup>	84.619 <sup>ns</sup>	0.144 <sup>ns</sup>	20.073 <sup>ns</sup>
Resíduo	53	3.122	1.754	0.464	34.385	0.082	16.857
Total	57						
CV (%)		20.91	22.44	16.20	41.48	46.93	25.92

\*, \*\* significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de Tukey, ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV - Coeficiente de variação.

Dos parâmetros biométricos analisados *in vitro*, houve diferença significativa apenas para a área foliar (AF), com as maiores médias no meio sem (8.660) e com 10 mg L<sup>-1</sup> de

$\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (9.678), que diferiram dos demais tratamentos (Tabela 3). Portanto, a utilização ou não de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  interfere de forma significativa no cultivo *in vitro* apenas para esta variável.

Dos parâmetros biométricos analisados após 28 dias de cultivo *ex vitro*, houve diferença significativa apenas para o parâmetro comprimento aéreo (CA), sendo que nas concentrações de 2,5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  foram observadas as maiores médias, 9,318 cm e 9,458 cm, respectivamente, diferindo da concentração de 5  $\text{mg L}^{-1}$  (7,169 cm) (tabela 3) Assim, nestas condições de cultivo, apenas esta variável sofre efeito significativo do  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ .

**Tabela 3:** Parâmetros relacionados ao crescimento *in vitro* e *ex vitro* de *B. antiacantha* cultivadas em diferentes concentrações de silicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ).

Concentrações $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Área foliar (cultivo <i>in vitro</i> )	Comprimento aéreo (cultivo <i>ex vitro</i> )
0	8.660a	8.509ab
2,5	5.522b	9.318a
5	5.928b	7.169b
10	9.678a	9.458a
15	6.632b	7.936ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.2 Fluorescência da clorofila *a* *in vitro* e *ex vitro*

De acordo com os resultados da ANOVA dos parâmetros do teste JIP (Tabela 5) não houve interação significativa entre os fatores analisados. Mas estes fatores variaram independentemente. Das variáveis analisadas houve diferença significativa para o fator tempo nos parâmetros  $F_0$ ,  $\text{ABS/RC}$ ,  $\text{TR}_0/\text{RC}$ ,  $\text{ET}_0/\text{RC}$ ,  $\text{DI}_0/\text{RC}$ ,  $\text{RC/CS}_0$ ,  $\text{PI}_{(\text{ABS})\text{total}}$  e  $\text{Sm/T}_{\text{Fmax}}$ . Para o fator concentração os parâmetros que apresentaram diferença significativa foram  $\text{ABS/RC}$  e  $\text{DI}_0/\text{RC}$ .

**Tabela 5:** Resumo da Análise de Variância para os parâmetros,  $F_0$  = Fluorescência inicial ou mínima;  $F_v/F_m$  = Eficiência fotoquímica máxima do FSII;  $ABS/RC$  = Fluxo de absorção de energia por centro de reação;  $TR_0/RC$  = Fluxo de energia capturada por centro de reação no  $t=0$ ;  $ET_0/RC$  = Fluxo de transporte de energia por centro de reação no  $t=0$ ;  $DI_0/RC$  = Fluxo de energia dissipada por centro de reação no  $t=0$ ;  $RC/CS_0$  = Quantidade de centros de reação do FSII ativos por seções cruzadas (CS) em  $t=0$ ;  $PI_{(ABS)total}$  = Índice de desempenho total, medindo a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI;  $Sm/TF_{max}$  = fração média de CR abertos no período de tempo de 0 a  $TF_{max}$  (tempo de produção da fluorescência máxima), no cultivo *in vitro* de *B. antiacantha*

FV	Quadrado Médio					
	GL	$F_0$	$F_v/F_m$	$ABS/RC$	$TR_0/RC$	
Concentrações $Na_2SiO_3$	4	3478.833 <sup>ns</sup>	0.003 <sup>ns</sup>	0.170*	0.047 <sup>ns</sup>	
Tempo	4	47771.333**	0.005 <sup>ns</sup>	0.707**	0.186**	
Concentrações $Na_2SiO_3$ X Tempo	16	2149.625 <sup>ns</sup>	0.002 <sup>ns</sup>	0.041 <sup>ns</sup>	0.020 <sup>ns</sup>	
Resíduo	50	3514.880	0.002	0.058	0.021	
Total	74					
CV (%)		11.19	6.57	10.09	8.17	

FV	Quadrado Médio					
	GL	$ET_0/RC$	$DI_0/RC$	$RC/CS_0$	$PI_{(ABS)total}$	$Sm/T_{Fmax}$
Concentrações $Na_2SiO_3$	4	0.007 <sup>ns</sup>	0.054*	505.151 <sup>ns</sup>	2.663 <sup>ns</sup>	0.0002 <sup>ns</sup>
Tempo	4	0.035**	0.178**	2210.273*	9.154**	0.0006*
Concentrações $Na_2SiO_3$ X Tempo	16	0.004 <sup>ns</sup>	0.007 <sup>ns</sup>	321.741 <sup>ns</sup>	1.207 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>
Resíduo	50	0.005	0.015	609.326	1.192	0.0001
Total	74					
CV (%)		9.15	20.92	9.23	30.68	24.60

\*, \*\* significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste de Tukey, ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV - Coeficiente de variação.

Na interpretação dos parâmetros do teste JIP, originados a partir da cinética de emissão de fluorescência, a maioria dos parâmetros variaram significativamente em função da concentração de  $Na_2SiO_3$  ( $mg L^{-1}$ ) e tempo de aclimatização (dias), mas não foi possível verificar interação em função destes fatores analisados, estes foram independentes (Tabela 6).

**Tabela 6:** Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* deduzidos a partir da análise do teste JIP de *B. antiacantha* cultivadas por 28 dias em diferentes concentrações de silicato de sódio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>)

Concentração Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Variáveis								
	F <sub>0</sub>	Fv/Fm	ABS/RC	TR <sub>0</sub> /RC	ET <sub>0</sub> /RC	DI <sub>0</sub> /RC	RC/CS <sub>0</sub>	PI <sub>(ABS)total</sub>	Sm/T <sub>Fmax</sub>
0	513.20a	0.769a	2.226b	1.704b	0.825a	0.522b	276.04a	4.233a	0.052a
2,5	515.46a	0.758a	2.371ab	1.806ab	0.852a	0.564ab	264.65a	3.556ab	0.056a
5	542.93a	0.734a	2.481a	1.858a	0.878a	0.624ab	264.33a	3.518ab	0.062a
10	546.33a	0.735a	2.490a	1.812ab	0.835a	0.680a	261.49a	3.415ab	0.056a
15	530.73a	0.736a	2.390ab	1.806ab	0.825a	0.583ab	276.04a	3.076b	0.052a

Tempo (dias)	Variáveis								
	F <sub>0</sub>	Fv/Fm	ABS/RC	TR <sub>0</sub> /RC	ET <sub>0</sub> /RC	DI <sub>0</sub> /RC	RC/CS <sub>0</sub>	PI <sub>(ABS)total</sub>	Sm/T <sub>Fmax</sub>
0	511.06b	0.771a	2.168b	1.661b	0.778c	0.507b	282.70a	4.810a	0.061a
7	598.66a	0.723a	2.646a	1.906a	0.836abc	0.737a	274.00ab	2.869b	0.044b
14	578.80a	0.738a	2.602a	1.919a	0.908a	0.684a	269.01ab	2.938b	0.060a
21	467.86b	0.739a	2.247b	1.750b	0.870ab	0.498b	251.85b	3.668b	0.058ab
28	492.26b	0.761a	2.297b	1.750b	0.824bc	0.546b	259.18ab	3.512b	0.054ab

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, em cada parâmetro, não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. F<sub>0</sub> = Fluorescência inicial ou mínima; Fv/Fm = Eficiência fotoquímica máxima do FSII; ABS/RC = Fluxo de absorção de energia por centro de reação; TR<sub>0</sub>/RC = Fluxo de energia capturada por centro de reação no t=0; ET<sub>0</sub>/RC = Fluxo de transporte de energia por centro de reação no t=0; DI<sub>0</sub>/RC = Fluxo de energia dissipada por centro de reação no t=0; RC/CS<sub>0</sub> = Quantidade de centros de reação do FSII ativos por seções cruzadas (CS) em t=0; PI<sub>(ABS)total</sub> = Índice de desempenho total, medindo a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI; Sm/TF<sub>max</sub> = fração média de CR abertos no período de tempo de 0 a TF<sub>max</sub> (tempo de produção da fluorescência máxima).

### Concentração de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>

A maioria dos parâmetros do teste JIP (F<sub>0</sub>, Fv/Fm, ET<sub>0</sub>/RC, RC/CS<sub>0</sub>, Sm/T<sub>(Fmax)</sub>,) não diferiu significativamente em função das diferentes concentrações de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.

Para ABS/RC os maiores valores foram obtidos para os tratamentos com 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, que diferiram apenas da concentração 0. Em TR<sub>0</sub>/RC o maior resultado foi com 5 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, e diferiu apenas da concentração 0 mg L<sup>-1</sup>. E em DI<sub>0</sub>/RC obteve o maior valor com 10 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> que diferiu apenas da concentração 0 mg L<sup>-1</sup>.

O índice de desempenho fotossintético PI<sub>(ABS)total</sub> teve o menor resultado em plântulas na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> e diferiu apenas das plântulas na concentração de 0 mg L<sup>-1</sup>.

### Tempo de aclimatização

A fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi maior aos 7 e 14 dias de aclimatização (598.66 e 578.80, respectivamente) e diferiu ( $p \leq 0,05$ ) dos demais dias. A eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) não apresentou diferença em função do tempo de aclimatização.

Em relação aos parâmetros relacionados aos fluxos específicos de energia por centro de reação (RC), os maiores resultados dos parâmetros ABS/RC, TR0/RC e  $DI_0$ /RC foram aos 7 e 14 dias, que diferiram dos demais. Para ET0/RC o maior valor foi aos 14 dias (0.908), que diferiu de 0 dias e 28 dias.

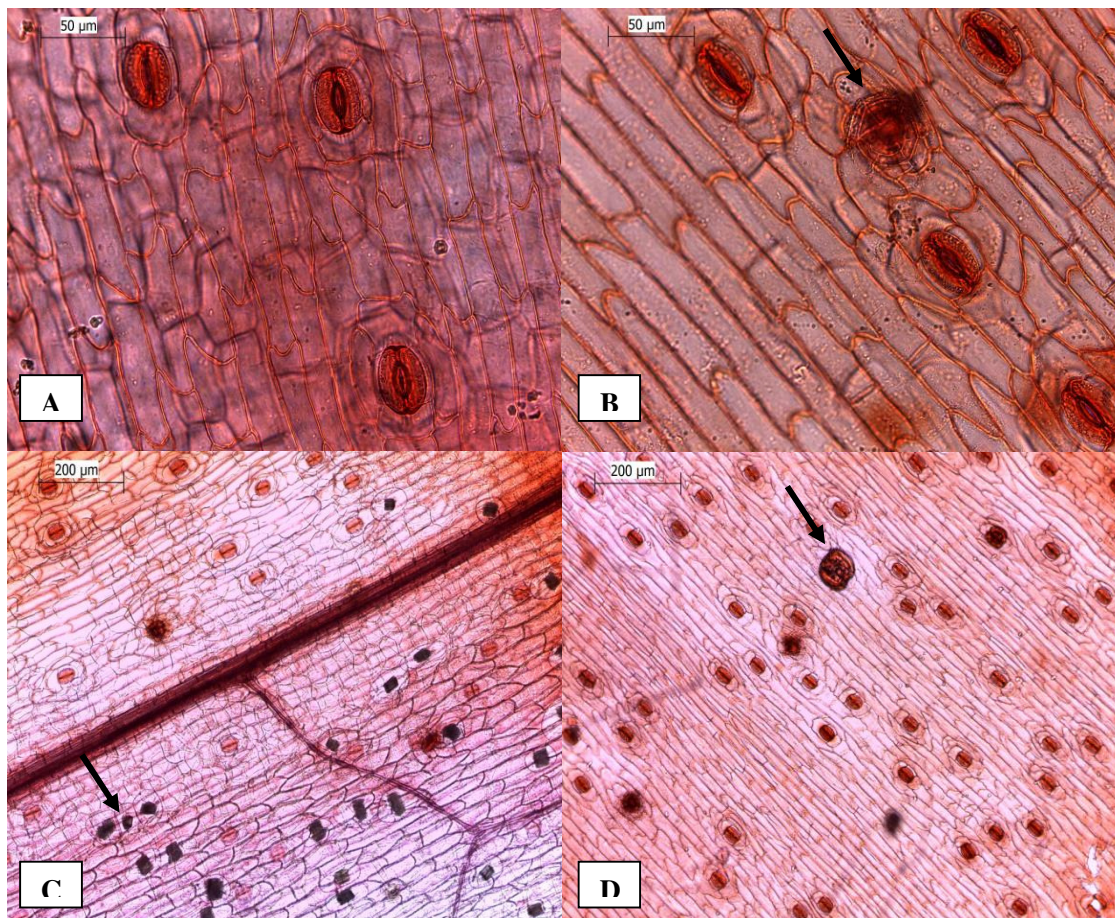
A densidade de centro de reação por seção transversal (CS)(RC/CS<sub>0</sub>) foi maior nas plantas em 0 dias (282.7) e diferiu das plântulas aos 21 dias.

O índice de desempenho total [ $PI_{(ABS)total}$ ] teve o maior resultado no tempo 0 (4.810), diferindo significativamente dos demais tratamentos.

Para  $Sm/T_{Fmax}$  (fração média de CR abertos no período de tempo de 0 a  $T_{Fmax}$  (tempo de produção da fluorescência máxima) os maiores valores foram para 0 e 14 dias, que diferiram apenas de 7 dias.

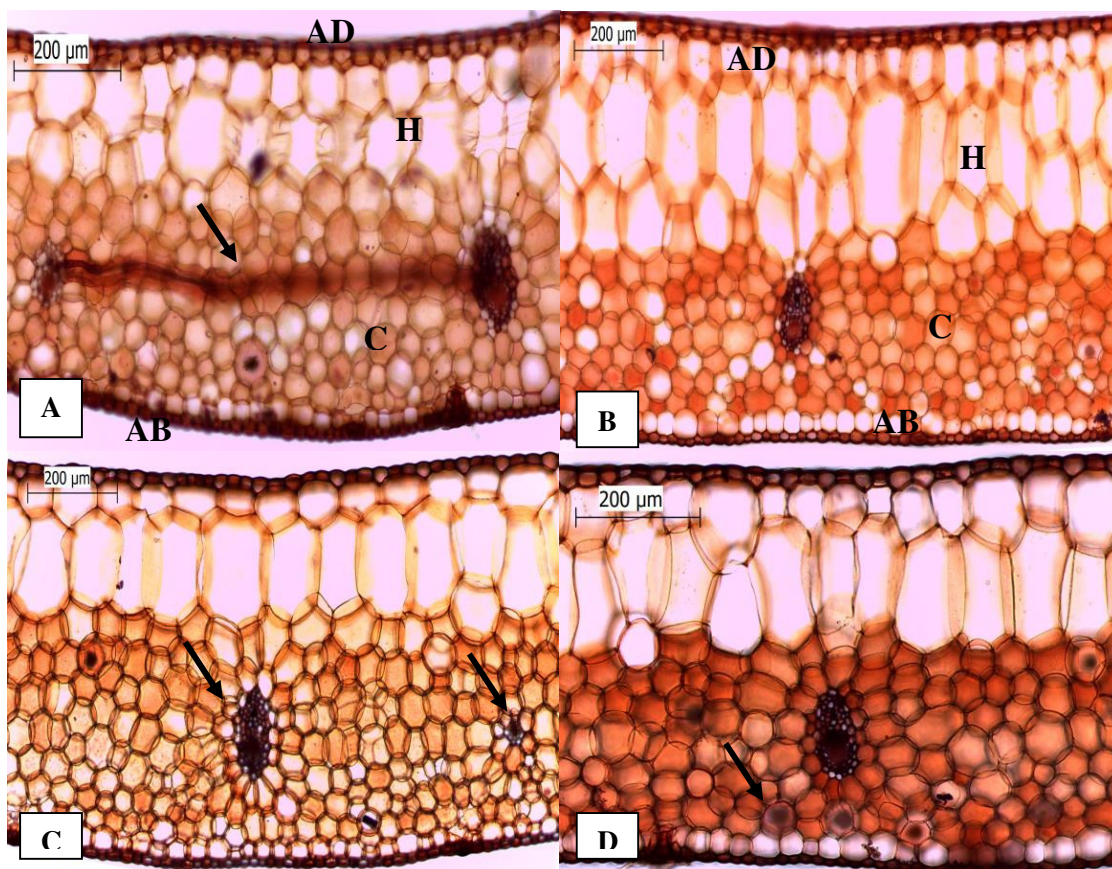
### 3.3 Anatomia *ex vitro*

Secções paradérmicas da face abaxial (FAB) das folhas são mostradas na figura 1. As folhas de *B. antiacantha* apresentam estômatos tetracíticos com distribuição hipoestomática (Figura 1A). Nota-se a presença de ráfides (Figura 1C) e tricomas (Figura 1B-C-D) nesta face das folhas.



**Figura 1:** Seções paradermicas da face abaxial de folhas de *B. antiacantha* na presença de diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . A) Estômatos tetracíticos indicados pela seta ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ). B) Detalhe para o tricoma indicado pela seta ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ). C) Detalhe de Ráfides indicados pela seta ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ). D) Estômatos e tricomas ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ )

Seções transversais de folhas de *B. antiacantha* (Figura 2) apresentaram uma camada de células epidérmicas em ambos os lados da folha, parênquima de armazenamento de água (hidrênquima) contendo células que não possuem clorofila com células de paredes finas na parte lateral da face adaxial, parênquima clorofiliano (clorênquima) com células isodiamétricas, feixes vasculares colaterais, geralmente feixes maiores alternados com os menores (Figura 2 A-C), e foram cercados por fibras de esclerênquima (Figura 2 A-B-C-D). O parênquima clorofiliano localiza-se entre os feixes vasculares, numa faixa contínua em toda a extensão do limbo. É constituído por várias camadas de células de contorno arredondado e paredes finas, dispostas, por vezes, de forma bastante concêntrica ao redor dos feixes vasculares. O mesofilo tem uma organização dorsiventral (Figura 2 B).



**Figura 2:** Secções paradérmicas da face abaxial de folhas de *B. antiacantha* na presença de diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . A) Conexão entre os feixes vasculares maior e menor está indicada pela seta ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ). B) Mesófilo dorsiventral ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). C) Feixes vasculares maiores alternados com menores estão indicados pelas setas ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). D) Presença de ráfides (seta preta) no clorênquima ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ). AD epiderme adaxial, AB epiderme abaxial, H hidrênquima, C clorênquima.

De acordo com os resultados da Análise de Variância, houve diferença significativa apenas para os parâmetros espessura da epiderme adaxial (EEAD) e para o número de estômatos (NE) (Tabela 7).



**Tabela 7:** Resumo da Análise de Variância para os parâmetros espessura da epiderme adaxial (EAD), espessura da epiderme abaxial (EAB), espessura do clorênquima (C), espessura do hidrênquima (H) e número de estômatos (NE) de plântulas de *B. antiacantha* cultivadas *ex vitro*

FV	Quadrado Médio					
	GL	EEAD	EEAB	C	H	NE
Concentrações Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	4	37.069*	6.879 <sup>ns</sup>	5419.114 <sup>ns</sup>	3254.547 <sup>ns</sup>	302.159**
Resíduo	35	10.053	5.214	2140.156	3528.322	36.355
Total	39					
CV (%)		13.60	16.21	15.48	19.82	17.50

\*, \*\* significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de Tukey, ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV - Coeficiente de variação.

O valor da EEAD foi maior nas folhas de plântulas cultivadas nas concentrações de 0 e 15 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> (25.30 µM em ambas), diferindo apenas daquelas encontradas na concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> (20.38 µM) (Tabela 8). A maior densidade estomática (correspondente ao número de estômatos) foi observada nas folhas de plântulas cultivadas nas concentrações de 2,5 e 5 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, respectivamente 45,40 e 37,83, diferindo significativamente apenas daquelas encontradas na 15 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> (26,16) (Tabela 8 e Figura 1).

**Tabela 8:** Anatomia foliar de plântulas de *B. antiacantha* cultivadas *ex vitro* em diferentes concentrações de silicato de sódio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>).

Concentrações Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Espessura Epiderme adaxial (EEAD)	Número estômatos (NE)
0	25.30a	29.83bc
2,5	20.38b	45.40a
5	21.93ab	37.83ab
10	23.65ab	34.83bc
15	25.30a	26.16c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Crescimento *in vitro* e *ex vitro*

Analisando o resumo da Análise de Variância dos parâmetros avaliados *in vitro* (Tabela 1) observa-se que o coeficiente de variação (CV) oscilou entre 7,51 a 17,80%. Para os resultados da análise de variância das variáveis analisadas em condição *ex vitro* (Tabela 2) CV variou entre 16,20 a 46,93%. Para este experimento, o CV foi comparado com os sugeridos por Werner et al. (2012) que consideram os coeficientes de variação como baixos, quando são inferiores à 6,44%; médios, quando estão entre 6,44 e 36,96%; altos, quando estão entre 36,96 e 52,22% e muito alto, quando são superiores à 52,22%. Portanto, observa-se que os CV dos parâmetros analisados em condições *in vitro* e *ex vitro*, estão na sua maioria, dentro da faixa de valores médios.

O silício (Si) é um elemento típico benéfico. Seus efeitos positivos foram observados em algumas espécies de plantas, tais como arroz (BARBOSA FILHO et al. 2001), trigo, cevada (NABLE et al., 1990; ALI et al., 2013), orquídeas (ZHOU, 1995; PASQUAL et al. 2011; SOARES et al., 2011), banana (ASMAR et al., 2013) e morangueiro (BRAGA et al., 2009). Esses efeitos são geralmente expressos de forma mais clara sob condições de estresse e são normalmente evidentes em plantas que acumulam este elemento. Isso ocorre porque a maioria dos efeitos de Si são expressos através de sua deposição sobre as folhas e caules (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001).

A maioria das espécies vegetais pode ser classificada como acumuladoras ou não acumuladoras de Si e variar no teor armazenado. Plantas das famílias Poaceae, Ciperaceae e Equisetaceae demonstram altos níveis de acúmulo de Si (>4%); Brassicaceae, Urticaceae e Commelinaceae demonstram níveis intermediários de Si (2-4%), enquanto a maioria das espécies demonstra baixo acúmulo, níveis abaixo de 2% (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001; HODSON et al., 2005). Plantas consideradas não acumuladoras apresentam menor densidade de transportadores de Si do apoplasto para o simplasto e um defeito nos transportadores de Si das células do córtex para o xilema, comparadas às plantas acumuladoras (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001).

Considerando que apenas os parâmetros área foliar (para as plântulas *in vitro*) e comprimento aéreo (para as plântulas *ex vitro*) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> testados, e que Bromeliaceae é uma família de monocotiledôneas, e sabe-se da existência de espécies não acumuladoras de Si presentes também no grupo das

monocotiledôneas, sugere-se a possibilidade de que *B. antiacantha* possa ser uma espécie não acumuladora ou ser uma baixa acumuladora de Si e, por, os efeitos não foram observados nos demais parâmetros de crescimento das plantas.

A grande variação no teor de Si entre espécies de plantas é o resultado de diferentes habilidades de sua captação pelas raízes (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001). Pode-se supor, também, com os resultados do presente experimento, que as plantas possam ter absorvido Si, porém, este tenha ficado retido nas raízes e não tenha sido translocado para a parte aérea.

Considerando o comportamento distinto do Si de acordo com a espécie, alguns estudos mostram resultados contrastantes ao do presente trabalho. Braga et al. (2009) comparando os resultados do cultivo *in vitro* de morangueiro em meio MS e na presença 1 g L<sup>-1</sup> de silicato de cálcio (CaSiO<sub>3</sub>), silicato de sódio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) e silicato de potássio (K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>), observaram que os maiores valores encontrados para os parâmetros número de folhas e massa de matéria fresca e seca estavam nos tratamentos apenas com meio MS ou MS+Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, não diferindo entre si.

Em trabalho de Asmar et al. (2013) foram testadas as mesmas três fontes de Si (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> e CaSiO<sub>3</sub>), associadas ao meio MS, na mesma concentração de 1 g L<sup>-1</sup>, no crescimento *in vitro* de bananeira 'Grande Naine'. Não houve diferença significativa para os parâmetros número de folhas, número de raízes e comprimento de parte aérea. O maior comprimento de raiz foi observado nos tratamentos com Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>. A maior massa seca de raiz foi registrada no tratamento com Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>. Estes resultados estão de acordo com Malavolta (2006), que afirma que o Si aumenta o diâmetro dos caules, refletindo assim, em maiores massas fresca e seca de parte aérea.

Soares et al. (2011), trabalhando *in vitro* com *Cattleya loddigesii*, avaliaram diferentes concentrações de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> (0, 5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>) e K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> (0, 5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis. As plântulas cultivadas em meio MS com 5 mg L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> e de 20 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> apresentam maior número de raízes e de folhas e maior comprimento da parte aérea e de raízes.

Zhou (1995) encontrou maior comprimento aéreo em plântulas de *Phalaenopsis* quando estas foram cultivadas em meio MS contendo concentrações de 0,1 - 1,0 mg L<sup>-1</sup> de CaSiO<sub>3</sub>. No presente experimento, em condições *ex vitro*, os maiores comprimentos aéreos foram observados nas concentrações de 2,5 mg L<sup>-1</sup> (9,318 cm) e 10 mg L<sup>-1</sup> (9,458 cm) de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.

Os maiores valores para os parâmetros de crescimento de plântulas tratadas com Si sugerem que além dos seus efeitos na retenção da água (TRENHOLM et al., 2004) e aumento da eficiência na fase de aclimatização, ele poderia estar envolvido no metabolismo de parede celular e melhoria da capacidade de suas células em expandir-se, e conseqüentemente, aumentar o alargamento celular (GUNES et al., 2007).

Aspectos fisiológicos também podem estar envolvidos com as respostas obtidas no crescimento das plantas de *B. antiacantha* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. Condições ambientais de estresses estimulam os mecanismos de fotoproteção das plantas propagadas *in vitro*, o que pode levar a inibição da atividade ou fotoinibição do FSII (OSÓRIO et al., 2010; SÁEZ et al., 2012). Ambas as condições de fotoproteção reduzem a taxa de fotossíntese máxima e, conseqüentemente, ganho de carbono e o crescimento das plantas (VAN HEERDEN et al., 2007; TAKAHASHI; BADGER, 2011; ADAMS et al., 2013). Estes fatos poderiam justificar a ausência de diferenças significativas na maioria dos parâmetros de crescimento das plântulas em condição *in vitro* e *ex vitro*.

#### **4.2 Fluorescência da clorofila *a* *in vitro* e *ex vitro***

A fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi maior aos 7 e 14 dias de aclimatização. O aumento em  $F_0$  pode ser atribuído à inibição da transferência de elétrons da plastoquinona A ( $Q_A$ ) para a plastoquinona B ( $Q_B$ ), o que indica a ocorrência de danos na proteína D1 do centro de reação do FSII (DIAS; MARENCO, 2006). A proteína D1 faz parte do centro de reação do FSII. Esta proteína é facilmente danificada através do excesso de luz e então deve ser removida da membrana e substituída por uma cópia recentemente sintetizada. As outras partes do centro de reação do FSII são projetadas para serem recicladas. Assim, a proteína D1 é o único componente que precisa ser sintetizado (ARO et al., 1993). Esse aumento em  $F_0$  foi documentado como um dos sinais mais diretos de fotoinibição em plantas (ARO et al., 1993). Por outro lado, decréscimos em  $F_0$ , como o observado nos demais tratamentos, representam a reativação do centro de reação FSII foto-danificado ou inativado pela irradiação (DIAS; MARENCO, 2006). Este comportamento indica que houve a aclimatização das plântulas após os 14 dias. Se os danos às unidades do FSII forem parciais e recuperados em pouco tempo, têm-se o fenômeno da fotoinibição dinâmica, o qual pode ser observado pelo retorno dos valores ao das condições iniciais ou prévias ao estresse em  $F_0$  (LONG et al., 1994; OSMOND, 1994).

Sobre as diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , os parâmetros  $F_0$  e  $F_v/F_m$  não diferiram significativamente.

Em relação aos parâmetros relacionados aos fluxos específicos de energia, o aumento de  $\text{ABS}/\text{RC}$  e  $\text{TR}_0/\text{RC}$  acompanhado pelo aumento da dissipação de energia ( $\text{DI}_0/\text{RC}$ ) nos primeiros dias de aclimatização (observado aos 7 e 14 dias) sugerem um mecanismo de fotoproteção das plantas. Aumento de  $\text{ABS}/\text{RC}$  também foi obtido com 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ,  $\text{TR}_0/\text{RC}$  com 5  $\text{mg L}^{-1}$  e  $\text{DI}_0/\text{RC}$  com 10  $\text{mg L}^{-1}$ . A etapa seguinte ao processo de captura de energia ( $\text{TR}_0/\text{RC}$ ) é o fluxo de transporte desta energia por CR ( $\text{ET}_0/\text{RC}$ ). O fluxo de transporte de energia representa a taxa de reoxidação de  $Q_A$  e o seu aumento indica que houve aproveitamento da energia luminosa combinada com menor taxa de dissipação de energia ( $\text{DI}_0/\text{RC}$ ) (STRASSER et al., 2004). Esse aumento foi obtido nas plantas aos 14 dias, diferindo apenas das plantas em 0 e 28 dias. Aumentos dos valores dos fluxos de absorção ( $\text{ABS}/\text{RC}$ ) e de captura ( $\text{TR}_0/\text{RC}$ ) de energia, seguido por aumento no fluxo de transporte de energia ( $\text{ET}_0/\text{RC}$ ), sugere que a energia está sendo direcionada para o fluxo de transporte de energia, o que foi observado para as plantas aos 7 e 14 dias. Porém, os valores de  $\text{DI}_0/\text{RC}$  também foram elevados, sugerindo que parte da energia proveniente das elevações de  $\text{ABS}/\text{RC}$  e  $\text{TR}_0/\text{RC}$  que não está seguindo para o transporte de energia ( $\text{ET}_0/\text{RC}$ ), passa, então, a ser dissipado na forma de calor ( $\text{DI}_0/\text{RC}$ ) (ÖQUIST et al., 1992; STRASSER et al., 2004; DEMETRIOU et al., 2007).

Segundo Strasser et al. (2004), elevações em  $\text{DI}_0/\text{RC}$  estão diretamente relacionados a conversão de CR's redutores em CR's dissipadores, um mecanismo de fotoproteção do FSII em eventos onde não são observadas correlações fortes e significativas entre  $\text{ABS}/\text{RC}$  e  $\text{ET}_0/\text{RC}$ . Este comportamento foi observado nas plantas submetidas a concentração de 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . Dessa forma,  $\text{DI}_0/\text{RC}$  atua como um mecanismo de fotoinibição dinâmica, prevenindo danos permanentes ao aparato fotossintético e suas subunidades ativas por meio da rápida dissipação de energia excedente na forma de calor (ÖQUIST et al., 1992; HERMANS et al., 2003).

Nas plantas aos 0, 21 e 28 dias, as reduções dos valores de fluxo de absorção ( $\text{ABS}/\text{RC}$ ) e de captura ( $\text{TR}_0/\text{RC}$ ) de energia, foram seguidas por reduções no fluxo de transporte de energia  $\text{ET}_0/\text{RC}$  e na dissipação de calor ( $\text{DI}_0/\text{RC}$ ). Portanto, essas plantas podem não estar sofrendo com a fotoinibição dinâmica, indicando um aproveitamento da energia luminosa nas atividades fotossintéticas, com menor taxa de dissipação de energia (ÖQUIST et al., 1992; STRASSER et al., 2004).

A densidade de centro de reação por seção transversal ( $RC/CS_0$ ) foi maior nas plantas em 0 dias, que diferiu apenas das plantas aos 21 dias, o que mostra nestas plantas alta transferência ou fluxo de energia entre os sistema antena até os CR's do FSII (BERTAMINI et al., 2004; KALAJI et al. 2011). Nas diferentes concentrações de  $Na_2SiO_3$ ,  $RC/CS_0$  não apresentou diferença significativa, sugerindo que este parâmetro não foi afetado pelas concentrações de  $Na_2SiO_3$ .

O rendimento quântico fotoquímico primário máximo ( $Fv/Fm$ ) não apresentou diferenças significativas entre os dias do experimento, e entre as diferentes concentrações de  $Na_2SiO_3$ . Na ausência de estresse ambiental, os valores de  $Fv/Fm$  podem variar numa faixa de 0,75 a 0,85 (BOLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989). Mesmo que valores acima destes tenham sido obtidos nas plantas em 0 dias (*in vitro*)(0,77) e aos 28 dias (0,76), estes não diferiram dos demais. As reduções observadas nos valores de  $Fv/Fm$  constituem um indicador de danos fotoinibitórios quando as plantas estão submetidas a qualquer tipo de estresse e pode representar tanto uma regulação fotoprotetora reversível ou uma inativação irreversível do FSII (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009).

O índice de desempenho total medindo a performance até os aceptores de elétrons do FSI ( $PI_{(ABS)total}$ ) é um indicador de vitalidade da planta e tem sido apontado como um parâmetro mais suscetível para a identificação de estresses nos vegetais (CHRISTEN et al., 2007; OUKARROUM et al., 2007; YUSUF et al., 2010), visto que este incorpora em seu cálculo parâmetros relacionados com a conservação de energia de fótons absorvidos pelo FSII (ABS), captura da energia de excitação (TR) e conversão da energia de excitação para o transporte de energia para o intersistema (ET) e a redução dos aceptores finais do FSI (RE) (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008). O  $PI_{(ABS)total}$  não responde somente às perdas na atividade do FSII, mas também a danos relativos ao FSI (XIANG et al., 2013). Assim, valores menores das plantas dos 7 aos 28 dias *ex vitro*, resultam na inibição da doação de elétrons e redução dos aceptores finais do FSI, com conseqüente contribuição nas reduções de  $PI_{(ABS)total}$ . Valores menores também foram obtidos nas plantas submetidas a  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de  $Na_2SiO_3$ , que diferiram apenas das plantas de  $0 \text{ mg L}^{-1}$ .

O decréscimo dos valores de  $PI_{(ABS)total}$  na aclimatização é indicativo de um efeito negativo da luz na atividade do FSII e FSI (YUSUF et al., 2010). Esse decréscimo também foi verificado aos 7 dias de aclimatização com a Bromeliaceae *Neoregelia concentrica* em trabalho de Martins et al. (2015). Para  $Sm/T_{Fmax}$  os maiores valores foram para 0 e 14 dias, que diferiram apenas de 7 dias, indicando uma maior fração média de CR abertos no período de tempo 0 ao tempo de produção de fluorescência máxima. Nas diferentes concentrações de

$\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ,  $\text{Sm}/T_{\text{Fmax}}$  não apresentou diferença significativa, sugerindo que este parâmetro não foi afetado pelas concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ .

Condições ambientais de estresses, como a irradiância, estimulam os mecanismos de fotoproteção das plantas propagadas *in vitro*, o que pode levar a inibição da atividade ou fotoinibição do FSII (OSÓRIO et al., 2010; SÁEZ et al., 2012). Ambas as condições de fotoproteção reduzem a taxa de fotossíntese máxima e, conseqüentemente, ganho de carbono e o crescimento das plantas (VAN HEERDEN et al., 2007; TAKAHASHI; BADGER, 2011; ADAMS et al., 2013), Fato que pode justificar a ausência de diferenças significativas nos parâmetros de crescimento das plantas em condição *ex vitro*.

Dessa forma os parâmetros JIP mostraram efeito de fotoinibição aos 7 e 14 dias, e nas concentrações de 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , sendo, portanto, essas concentrações as que mais prejudicaram o funcionamento do FSII e conseqüentemente a eficiência fotossintética. Assim, pode-se inferir que o  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  não atuou melhorando o funcionamento do aparato fotossintético, visto que as demais concentrações do silicato (2,5 e 15  $\text{mg L}^{-1}$ ) não diferiram significativamente de 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$ .

### 4.3 Anatomia *ex vitro*

A anatomia foliar de *B. antiacantha* foi descrita e este tipo de análise estrutural de órgãos vegetativos é frequentemente observada e tem sido descrita em muitas bromeliáceas (PEREIRA et al., 2013; MARTINS et al. 2014, 2015, 2016). Na superfície da folha, a densidade estomática é um dos fatores mais importantes na detecção de tensão. O aumento deste parâmetro é uma resposta comum para a diminuição da área da superfície da folha, assegurando a troca gasosa e, conseqüentemente, o influxo adequado de carbono e controle dos processos de transpiração (ABBRUZZESE et al., 2009; GOMES et al., 2012). O aumento da densidade estomática, como o observado no presente trabalho para a concentração de 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , poderia ser uma resposta adaptativa para ajudar a sustentar uma taxa adequada de trocas gasosas, que é essencial para o crescimento e desenvolvimento (NEELU et al., 2000).

Soares et al. (2012) trabalhando *in vitro* com mudas de uma espécie nativa de orquídea (*Brassavola perrinii*) e de um híbrido (*Laeliacattleya* Culminantes "Tuilerie" x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach), testaram diferentes concentrações de  $\text{CaSiO}_3$  (0, 0,5, 1,0 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ ). Para a espécie nativa, o efeito de  $\text{CaSiO}_3$  sobre a densidade estomática da epiderme abaxial não foi significativo, enquanto

os maiores valores de densidade estomática na epiderme adaxial foram obtidos na ausência de  $\text{CaSiO}_3$ . Para as espécies híbridas, a maior densidade estomática foi obtida na concentração de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaSiO}_3$ , tanto na epiderme adaxial quanto abaxial.

O estômato é a conexão entre a planta e a atmosfera, podendo desempenhar importante papel nas respostas às condições ambientais (NILSON; ASSMANN, 2007). É encontrado, na maioria das plantas, predominantemente nas folhas e nos caules e consiste, basicamente, de um poro circundado por duas células-guarda, que podem ser usadas também na distinção taxonômica em espécies.

De acordo com Evert e Esaú (2006), os estômatos tetracíticos, como os observados em *B. antiacantha*, são frequentes em muitas famílias de monocotiledôneas. Estes estômatos são delimitados por quatro células subsidiárias. Duas destas células são paralelas às células-guarda. O outro par de células é polar e é frequentemente menor. Pasqual et al. (2011) observaram esse mesmo tipo de estômatos em híbridos de orquídeas, assim como Zanenga-Godoy e Costa (2003) relataram este tipo de estômatos em outras espécies de orquídeas.

A espessura da epiderme adaxial (EEAD) das folhas de *B. antiacantha* foi maior nas concentrações de  $0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , diferindo apenas da concentração de  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ . A espessura da epiderme abaxial (EEAB) não teve alterações em função da presença de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . A espessura da epiderme, possivelmente, atua diminuindo a evaporação de água a partir do tecido, impedindo o colapso das células por murchidão e garantindo a sobrevivência de espécies sob seca (SCATENA; SEGECIN, 2005).

Soares et al. (2012) testaram diferentes concentrações de  $\text{CaSiO}_3$  ( $0, 0,5, 1,0$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) no cultivo *in vitro* de *B. perrinii* e de orquídeas híbridas (*Laeliacattleya* Culminantes "Tuilerie" x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach). Os autores encontraram os maiores valores para a EEAD e EEAB na concentração de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ , tanto para a espécie nativa quanto para os híbridos de orquídeas.

A presença de cristais de oxalato de cálcio do tipo ráfide foi observada na face abaxial da epiderme de *B. antiacantha*. Esses cristais têm sido motivo de investigação, devido à sua importância ecológica, uma vez que a presença de cristais nas plantas é relacionada com o mecanismo de defesa contra a herbivoria (LUCAS et al., 2000; XIANG; CHEN, 2004) e pela importância fisiológica, pois os cristais regulam o nível de cálcio nos tecidos (VOLK et al., 2002), além de auxiliar na distribuição da luz para os cloroplastos com a dissipação do excesso de luz, durante períodos de alta intensidade luminosa (FRANCESCHI, 2001; PROENÇA; SAJO, 2007).



Os resultados do presente trabalho mostram que o  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  nas concentrações de 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  ou a sua ausência e na concentração de 15  $\text{mg L}^{-1}$  promoveram efeitos benéficos na anatomia foliar de plântulas de *B. antiacantha* em condição *ex vitro*, ocasionando aumento da densidade estomática e da espessura da epiderme adaxial, respectivamente, o que poderia levar a um maior controle nos processos de transpiração.

## 5. CONCLUSÃO

Em relação aos parâmetros de crescimento de *B. antiacantha*, em condições *in vitro*, apenas a área foliar foi afetada pela presença de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , com as maiores médias observadas na concentração de 10  $\text{mg L}^{-1}$  ou na ausência deste elemento. Nas condições de cultivo *ex vitro*, apenas o comprimento aéreo apresentou diferença significativa, com as maiores médias encontradas nas concentrações de 2,5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ .

A fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi maior aos 7 e 14 dias de aclimatização, o que indica a ocorrência de danos na proteína D1 do centro de reação do FSII, efeito da fotoinibição. Por outro lado, decréscimos em  $F_0$ , como o observado nos demais dias, representam a reativação do centro de reação FSII foto-danificado ou inativado pela irradiação. Este comportamento indica que houve a aclimatização das plântulas após os 14 dias.

Em relação aos parâmetros relacionados aos fluxos específicos de energia, aumentos em ABS/RC e TR0/RC foram observados aos 7 e 14 dias, e nas concentrações de 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ . Esse aumento foi acompanhado por aumentos de DI0/RC. Para ET0/RC o maior valor foi aos 14 dias. Aumentos nesses parâmetros sugerem um mecanismo de fotoproteção das plantas.

Valores menores do parâmetro  $\text{PI}_{(\text{ABS})\text{total}}$  das plantas aos 7 e aos 28 dias de cultivo *ex vitro* na concentração de 15  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , resultaram na inibição da doação de elétrons e redução dos aceptores finais do FSI, com consequente contribuição nas reduções de  $\text{PI}_{(\text{ABS})\text{total}}$ .

Nas diferentes concentrações de silicato de sódio, os parâmetros  $F_0$ ,  $F_v/F_m$ ,  $\text{ET}_0/\text{RC}$ ,  $\text{RC}/\text{CS}_0$ ,  $\text{Sm}/T_{(F_{\text{max}})}$  não apresentaram diferença significativa, sugerindo que estes parâmetros não foram afetados pelas concentrações de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ .

Quanto a anatomia foliar as concentrações de 2,5  $\text{mg L}^{-1}$  e 15  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  promoveram efeitos benéficos na plântula por meio do aumento da densidade estomática e da espessura da epiderme adaxial, respectivamente.

## Referências Bibliográficas

- ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M.; CENTOFANTE, A. R.; OLIVEIRA, C. Anatomia foliar de ipê- Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.) – (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro e in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences** Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.
- ABBRUZZESE, G.; BERITOGNOLO, I.; MULEOB, R.; PIAZZAIA, M.; SABATTIA, M.; MUGNOZZA, G. S.; KUZMINSKY, E. Leaf morphological plasticity and stomatal conductance in three *Populus alba* L. genotypes subjected to salt stress. **Environ. Exp. Bot.** 66:381-388. 2009.
- ADAMS, W. W.; MILLER, O.; COHU, C. M.; DEMMIG-ADAMS, B. May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? **Photosynth Res** 117:31–44. 2013.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOERGER, M. R. T.; COSTA, C. G.; BARROS, C. F. Epiderme. In: APPEZZATODA- GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, p. 87-108. 2006.
- ALI, S.; FAROOQ, M. A.; YASMEEN, T.; HUSSAIN, S.; ARIF, M. S.; ABBAS, F.; BHARWANA, S. A.; ZHANG, G. The influence of silicon on barley growth, photosynthesis and ultra-structure under chromium stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 89, p. 66–72, 2013.
- ARAUJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**. 7:463-472. 2009.
- ARO, E. M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1143, n.2, p.113–134, 1993.
- ASMAR, S. A.; PASCAL, M.; ARAUJO, A. G; SILVA, R. A. L. S.; RODRIGUES, F. A.; PIO, L. A. S. Características morfológicas de bananeiras ‘Grande Naine’ aclimatizadas em resposta a utilização de silício *in vitro*. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p.73-82, 2013.
- BARBOSA FILHO, M. P.; SNYDER, G. H.; FAGERIA, N. K.; DATNOFF, L. E.; SILVA, O. F. Silicato de cálcio como fonte de silício para arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 325-330, 2001.
- BERTAMINI M.; MUTHUCHELIAN K.; NEDUNCHEZHIAN N. Photoinhibition of photosynthesis in sun and shade grown leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Photosynthetica**. 42:7-14. 2004.
- BRAGA, F. T.; NUNES, C. F.; FAVERO, A. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária**. 2009.
- BUKATSCH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau safranina. **Microkosmos** 61:255–256, 1972.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, Corvallis, v.84, n. 3, p. 236-242, 1994.

DIAS, D. P.; MARENCO, R. A. Photoinhibition of photosynthesis in *Minuartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. **Photosynthetica**, v.44, n.2, p.235-240, 2006.

DEMETRIOU G.; NEONAKI C.; NAVAKOUDIS E.; KOTZABASIS K. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus - the protective role of polyamines. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1767:272-280. 2007.

DEREN, C. W.; DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; MARTIN, F. G. Silicon concentration, disease response, and yield components of rice genotypes grown on flooded organic histosols. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 3, p. 733-737, may/jun. 1994.

EPSTEIN, E. Silicon in plants: Facts vs. concepts. Silicon in Agriculture. Chapter 1. DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDORFER, G.H.(Editors). **Elsevier Science B.V.** 2001.

EVERT, R. F.; ESAÚ. Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3ed. Madison: **Wiley Interscience**, 2006.

FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FRANCESCHI, V. Calcium oxalate in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 361-427, 2001.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C.; SANTOS, C. D.; ANTUNES, C. S. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.37, n.2, p. 185-190, 2008.

GOMES, M. P.; SA, T. C. L. L.; MARQUES, M.; MARTINS, G. A.; CARNEIRO, M. M. L. C.; SOARES, A. M. Cd-tolerance markers of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen plants: anatomical and physiological features. **Braz J Plant Physiol** 24:293-304. 2012.

GUERRA, M. P.; VESCO, L. L. D. Strategies for the micropropagation of bromeliads. In: Jain SM, Ochatt SJ (eds) Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: methods in molecular biology. **Humana Press**, New York, pp 47-66, 2010.

GUNES, A.; INAL, A.; BAGCI, E. G.; COBAN, S. Silicon-mediated changes on some physiological and enzymatic parameters symptomatic of oxidative stress in barley grown in sodic-B toxic soil. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 6, p. 807-811, 2007.

- HERMANS, C.; SMEYERS, M.; RODRIGUEZ, R. M.; DELHAYE, J. P. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. **Journal of Plant Physiology**. 160:81-90. 2003.
- HODSON, M. J.; WHITE, P. J.; MEAD, A.; BROADLEY, M. R. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. **Annals of botany**, London, v. 96, p. 1027-1046, 2005.
- JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. **Mc Graw-Hill** (2<sup>a</sup> Ed.), New York, p523, 1940.
- KALAJI, H. M.; GOVINDJEE, B. K.; KOSCIELNIAK, J.; ZUK-GOŁASZEWSKAE, K. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**. 73:64-72. 2011.
- LAING, M. D.; ADANDONON, A. **Silicon and insect management – review**. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU/ICIAG, 152 p., 2005.
- LIANG, Y.; SUN, W.; ZHU, P.C. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 147, p. 422-428, 2007.
- LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 45:633-662, 1994.
- LUCAS, P. W.; TURNER, I. M.; DOMINY, N. J.; YAMASHITA, N. Mechanical defenses to herbivory. **Annals of Botany**, London, v. 86, n.5, p. 913-920, 2000.
- KALAJ, H. H.; GOVINDJEE BOSA, K.; KOSCIELNIAK, J.; ZUK-GOLASZEWSKA, K. Effects of salt stress on photosystemII efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. **Environ. Exp. Bot.**, in press. 2010.
- KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Manipulation of the culture environment on in vitro air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 83:251–257, 2005.
- MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATINOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.) Silicon in agriculture. Amsterdam: **Elsevier Science**, p. 17-39. 2001.
- MA, J. F.; YAMAJI, N. A silicon transporter in rice. **Nature**, London, v. 440, p. 688-691, 2006.
- MA, J. F.; YAMAJI, N. Functions and transport of silicon in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 65, p. 3049-3057, 2008.
- MALAVOLTA, E. Manual de nutrição de plantas. Piracicaba: **Ceres**, 638 p., 2006.
- MARTINS, J. P. R.; SCHIMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S.; CASTRO, E. M.; NANI, T. F.; PIRES, M. F.; PASQUAL, M. Direct organogenesis and leaf anatomy modifications *in*

*in vitro* of *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith (Bromeliaceae). **Pak J Bot** 46:2179–2187. 2014.

MARTINS, J. P. R.; SCHIMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S.; FALQUETO, A. R.; OTONI, W. C. Chlorophyll *a* fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 51:471- 481. 2015.

MARTINS, J. P. R.; PASCAL, M.; MARTINS, A. D.; RIBEIRA, S. F. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** v. 126, p. 43-57, 2016.

MEHTA, P.; JAJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 48, p. 16-20, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 473- 497, 1962.

NABLE, R. O.; LANCE, R. C. M.; CARTWRIGHT, B. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. **Annals of Botany**, London, v. 66, n. 1, p. 83-90, 1990.

NEELU, N.; KUMAR, M.; TOMAR, M.; BHATNAGAR, A.K. Influence of cadmium on growth and development of *Vicia faba* Linn. **Indian J Exp Biol** 38:819–823. 2000.

NILSON, S. E.; ASSMANN, S. M. The control of transpiration. Insights from Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 143, p. 19-27, 2007.

OUKARROUM, A., EL MADIDI, S., SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OJIP under drought stress and rewatering. **Environ. Exp. Bot.**, 60, 438-446. 2007.

ÖQUIST, G.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. **Planta**. 186:450-460. 1992.

OSMOND, C. B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds) Photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field. **Bios Scientific Publishers**, Oxford, pp 1-24, 1994.

OSÓRIO, M. L.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Chlorophyll fluorescence in micropropagated *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* plants in response to different irradiances. **Biol Plant** 54:415–422. 2010.

PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G.; SANTOS, R. R. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira** 29: 324-329, 2011.

- PEREIRA, T. A.; SILVA, L. C.; AZEVEDO, A.; PEREIRA, J. D. Leaf morpho-anatomical variations in *Billbergia elegans* and *Neoregelia mucugensis* (Bromeliaceae) exposed to low and high solar radiation. **Botany** 91:327–334, 2013.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo. **Acta Bot. Bras.**, 21:657-673, 2007.
- RICHMOND, K. E.; SUSSMAN, M. R. Got Silicon? The non-essential, beneficial plant nutrient. **Current Opinions in Plant Biology**, Cambridge, v. 6, p. 268-272, 2003.
- RODRIGUES, F. A. **Silício na agricultura**. 5. ed. Viçosa, MG: UFV, p.111-134, 2010.
- SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; SÁEZ, K. L.; SANCHEZ-OLATE, M.; LATSAGUE, M. I.; RÍOS, D.G. Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: a comparison between in vitro and nursery plants. **Biol Plant** 56:15–24. 2012.
- SANDOVAL, J. A.; MÜLLER, L. E.; WEBERLING, F. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Cirad, v. 49, n. 1, p. 37-46, 1994.
- SCATENA, V. L.; SEGECINI, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 28: 635-649. 2005.
- SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; ARAUJO, A. G. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 503-507, 2011.
- SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; BRAGA, F.T. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n.4, p. 413-421, 2012.
- STEFANOV, D.; PETKOVA, V.; DENEV, I. D. Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using JIP-test. **Scientia Horticult.**, 128, 1-6, 2011.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: Mathis P, editor. Photosynthesis: from light to biosphere. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**; p. 977–80. 1995.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, Probing photosynthesis; mechanisms, regulation and adaption, Yunus, M., Pathre U., Mohanty P., Ed., London: **Taylor and Francis**, p. 445-483. 2000.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration series. **Springer**, Dordrecht, pp 321–362, 2004.

STRAUSS, A. J.; KRUGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN HEERDEN, P. D. R. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. **Environ. Exp. Bot.**, v. 56, p. 147-157, 2003.

TAKAHASHI, S.; BADGERMR. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. **Trends Plant Sci** 16:53–60. 2011.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa, **Circular Técnica**, 24. 19p, 2001.

THACH, L. B.; SHAPCOTT, A.; SCHMIDT, S. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. **Photosynth. Res.**, v. 94, p. 423-436, 2007.

TRENHOLM, L. E.; DATNOFF, L. E.; NAGATA, R. T. Influence of silicon on drought and shade tolerance of St. Augustinegrass. **Horttechnology**, v. 14, n. 4, p. 487-490, 2004.

VAN HEERDEN, P. D. R.; SWANEPOEL, J. W.; KRÜGER, G. H. J. Modulation of photosynthesis in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO<sub>2</sub> assimilation. **Environ Exp Bot** 61:124–136. 2007.

VOLK, G. M.; LYNCH-HOLM, V.; KOSTMAN, T. A.; FRANCESCHI, V. R. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. **Plant Biology**, v. 41, p. 34-45, 2002.

XIA, J., LI, Y.; ZOU, D. Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. **Aquatic Bot.**, 80, 129-137, 2004.

XIANG, H.; CHEN, J. Interspecific variation of plant traits associated with resistance to herbivory among four species of *Ficus* (Moraceae). **Annals of Botany**, London, v. 94, p. 377-384, 2004.

WERNER, E. T.; MOTTA, L. B.; MARTINS, M. Q.; LIMA, A. B. P.; SCHMILDT, E. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos da cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Cult. Micropropagadas**, v.8, n. 1-2, p. 18-26, 2012.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI- MICHAEL, M.; GOVINDJEE.; SARIN, N. B. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, p. 1428–1438, 2010.

ZANEGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Leaf anatomy of four species of genus *Cattleya* Lind (Orchidaceae) of the Brazilian Central Plateau. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 1, p. 101-119, 2003.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, 1995.