

**MORFO-HISTOLOGIA DE CULTURAS NODULARES NA
MICROPROPAGAÇÃO DE *Aechmea setigera* MART. EX SCHULT. &
SCHULT. F. (BROMELIACEAE)**

Fermino Júnior PCP*, Lando AP**, Santos M***,
Pescador R****

Resumo

Aechmea setigera é uma espécie de Bromeliaceae da Amazônia Ocidental com potencial ornamental. A micropropagação por culturas nodulares consiste em uma estratégia de propagação massal, as quais apresentam alto potencial regenerativo, culminando na produção múltipla de brotos adventícios em condições de cultura adequadas. O objetivo deste trabalho foi induzir a formação de culturas nodulares a partir de folhas jovens com o uso do ácido-2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) combinado com cinetina (CIN), e caracterizar a estrutura e a ultraestrutura. Nódulos organogênicos e policêntricos foram induzidos após 20 dias de cultivo com 10 e 20 μM de 2,4-D + 1 μM de CIN em meio de cultura MS. Os nódulos em microscopia de luz apresentam organização definida com a zona de revestimento,

* Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas; Professor da Universidade Federal de Santa Catarina de Curitiba; Biólogo; Rodovia Ulysses Gaboardi, Km 03, 89.520000, Curitiba, Santa Catarina, Brasil; paulo.fermino@ufsc.br

** Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina; Bióloga; Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, *Campus* Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, 88040900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil; ana_lando_8_@hotmail.com

*** Doutora em Botânica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Professora da Universidade Federal de Santa Catarina; Bióloga; Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, *Campus* Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, 88040900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil; marisa.santos@ufsc.br

**** Doutora em Botânica pela Universidade de São Paulo; Professora da Universidade Federal de Santa Catarina; Engenheira Agrônoma; Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, *Campus* Universitário Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034000. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil; rosete.pescador@ufsc.br

cortical e medular. Em microscopia eletrônica de transmissão, as células da região cambial evidenciam parede celular delgada, núcleo grande, citoplasma denso, vacúolos, retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e numerosos amiloplastos. Os resultados suportam o fundamento de células pluripotentes como constituintes dos nódulos organogênicos.

Palavras-chave: Bromeliaceae. Organogênese. Histologia. Ultraestrutura.

Morpho-histology of nodular culture in micropropagation of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. F. (Bromeliaceae)

Abstract

Aechmea setigera is a species of Bromeliaceae of Western Amazon with ornamental potential. Micropropagation by nodule culture is a strategy of mass propagation, which has a high regenerative potential, culminating in the production of multiple adventitious shoots in suitable culture conditions. The objective of this study was to induce the formation of nodular cultures from young leaves using the acid-2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) combined with kinetin, and characterize the structure and the ultrastructure. Organogenic and polycentric nodules were induced after 20 days of culture at 10 and 20 μM of 2,4-D + 1 μM KIN in the MS culture medium. The nodules by light microscopy have defined organization with coating, cortical and medullary zones. In transmission electron microscopy, the cambial region cells show cell wall thin, large nucleus, dense cytoplasm, vacuoles, developed rough endoplasmic reticulum, and numerous amyloplasts. The results support the fundamentals of pluripotent stem cells into organogenic nodules.

Keywords: Bromeliaceae. Organogenesis. Histology. Ultrastructure.

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica está entre os biomas brasileiros com a maior biodiversidade,¹ apresentando cerca de 30.000 espécies de plantas ou 30% de todas as espécies de plantas da América do Sul.² Entretanto, a composição florística desse bioma é pouco conhecida.³ Nas florestas tropicais, a diversidade de epífitas compreende aproximadamente um terço das plantas vasculares, as quais são representadas principalmente por Orchidaceae e Bromeliaceae.⁴ De acordo com Martinelli e Moraes,⁵ a família Bromeliaceae contém o maior número de espécies com interesse para a conservação.

A família Bromeliaceae compreende 58 gêneros em 3.172 espécies e subespécies.^{6,7} As espécies de bromélias na Amazônia em geral são pouco conhecidas^{8,9} e podem ser consideradas ameaçadas de extinção em consequência do desmatamento. *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. F. possui hábito epifítico ou terrestre, com distribuição em geral no Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana e Amazônia Ocidental do Brasil, entre 70 e 550 m de altitude.¹⁰ Possui folhas grandes, verde intenso e suculentas, com espinhos nas margens,¹¹ e por sua beleza, apresenta potencial ornamental. O

gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. está entre os 15 gêneros de plantas de maior interesse para estudos de conservação.⁵

A propagação comercial de bromélias por sementes e brotações resulta em um número limitado de propágulos e comumente com patógenos.¹² O estabelecimento de protocolos de multiplicação com sistemas regenerativos *in vitro* de bromélias são estratégias que podem ser aplicadas tanto para a conservação quanto para a propagação em grande escala.¹³ Alguns padrões de respostas da morfogênese *in vitro*, como os observados em bromeliáceas, apresentam características diferenciadas aos sistemas regenerativos tradicionais.¹⁴ Recentemente, foi descrita uma rota regenerativa *in vitro* de bromélias baseada na indução de culturas nodulares (CNs).^{15,16,17} Culturas nodulares são definidas como grupos de nódulos organogênicos de forma globular, de coloração verde amarelada a translúcida, apresentando textura friável a levemente compacta e compostas basicamente por aglomerados meristemáticos que, em condições de cultivo adequado, resultam na regeneração múltipla de brotos.^{18,19}

As culturas de nódulos organogênicos já foram descritas para algumas famílias botânicas, como: Asteraceae,²⁰ Cannabinaceae,²¹ Clusiaceae,²² e Arecaceae.²³

De acordo com George e Debergh,²⁴ na organogênese direta existem estruturas organizadas, constituídas por uma camada superficial de meristemas apicais caulinares sobrepondo um núcleo interior de células vacuoladas que atuam como suporte mecânico e nutricional. Estruturas com tais características foram denominadas inicialmente colônias de organoides por Hunault,²⁵ entretanto, recentemente tem sido proposto o termo nódulos.²⁴ Estudos com histologia na morfogênese de nódulos são raros.²⁶ Os nódulos são compreendidos como células meristemáticas aglomeradas (*clusters*) de aspecto arredondado, formando unidades coesas.²⁴

De acordo com outros autores,¹⁹ a micropropagação por culturas nodulares envolve as fases de indução, multiplicação e regeneração da parte aérea, para posterior aclimatização. A fase de indução de culturas nodulares compreende processos de sinalização celular, estimulados por reguladores de crescimento.²⁷

O regulador de crescimento vegetal denominado ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) apresenta efetividade na indução de divisão celular e formação de calo.²⁷ A região basal das folhas de monocotiledôneas apresenta células nos tecidos vasculares com competência para a rediferenciação quando ativadas por reguladores de crescimento.²⁸

O objetivo deste trabalho foi induzir a formação de culturas nodulares com o uso do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) combinado com cinetina (CIN), visando à propagação massal, bem como analisar a estrutura dos nódulos organogênicos.

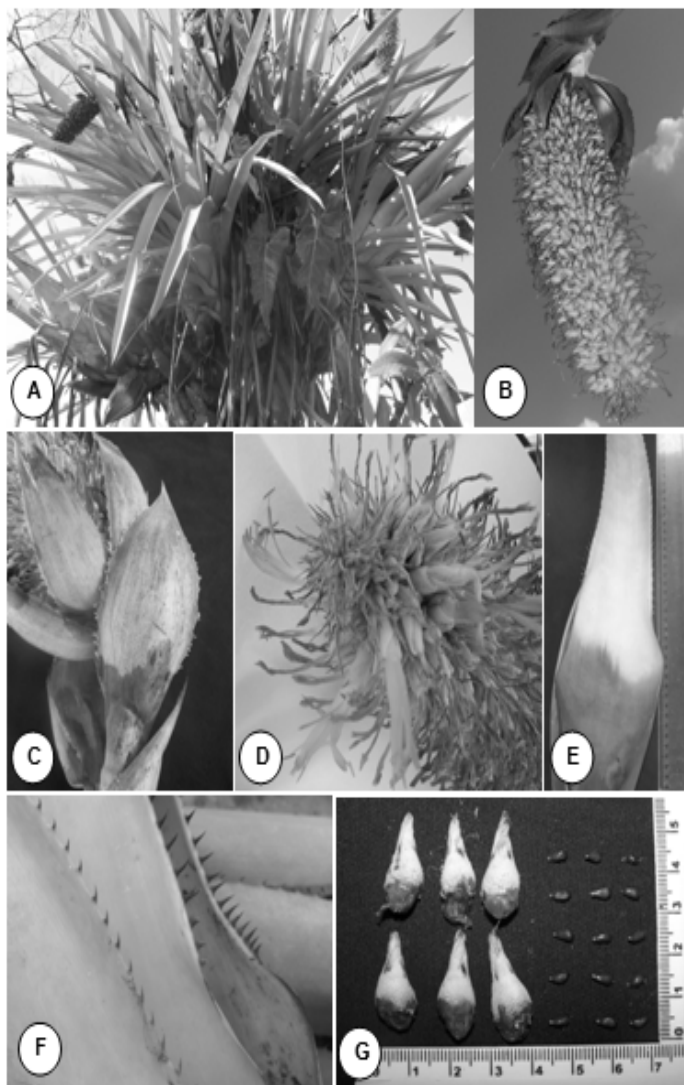
2 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos em estágio de maturação fisiológica foram coletados de plantas matrizes de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. F. sobre forófitos localizados no Município de Rio Branco, AC,

nas coordenadas geográficas de 10° 01' 28" S e 67° 42' 19" W. Exsicatas foram preparadas, identificadas e depositadas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) sob o número RB550638. As sementes foram removidas manualmente e desinfetadas durante 2 minutos em álcool 70%, seguidas de imersão por 25 minutos em solução de água sanitária comercial (2,0-2,5% de cloro ativo) e adicionada uma gota de Tween 20 em cada 100 mL de solução. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada e inoculadas em frascos de vidro tipo conserva (340 mL), contendo 30 mL de meio de cultura MS,²⁹ mais vitaminas de Morel,³⁰ 30 g L⁻¹ de sacarose e geleificado com 6 g L⁻¹ ágar-ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da esterilização por 15 minutos a 1,3 kgf cm⁻².

As culturas foram incubadas em sala de crescimento com 25 ± 2 °C, intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹ obtidas com lâmpadas fluorescentes Sylvania® branca fria, com 16 horas de fotoperíodo, com uma distância de 10-12 cm de altura das culturas.¹⁴

Figura 1 – *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. F. A. Indivíduos sobre forófito (Arecaceae); B. Detalhe da infrutescência; C. Aspecto da bráctea; D. Morfologia da inflorescência; E. Folha sob vista frontal da face abaxial; F. Espinhos presentes nas margens das folhas; G. Frutos e sementes individualizados



Fonte: os autores.

Após a germinação *in vitro*, segmentos nodais de plântulas estioladas foram excisados e inoculados em meio de cultura MS líquido estacionário, com vitaminas de Morel, 30 g L⁻¹ de sacarose e suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Microbrotos tiveram suas folhas jovens de aproximadamente 2 cm excisadas e inoculadas em frascos de vidro (340 mL) contendo meio de cultura MS semissólido, com vitaminas de Morel, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar-ágar e suplementado com 0, 5, 10 e 20 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + 1 µM de 6-furfurilaminopurina (CIN). As análises foram realizadas após 60 dias de cultura, consistindo no percentual de formação de nódulos e análises estruturais. Os experimentos foram organizados em delineamento completamente casualizados com seis repetições, sendo cada repetição composta por dois frascos contendo individualmente cinco explantes. Os resultados foram submetidos à análise de regressão com auxílio do programa ASSISTAT 7.7 beta.

Para as análises estruturais em microscopia de luz, os nódulos induzidos foram excisados e fixados em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,2 por 4 horas em câmara de vácuo. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica gradual. As amostras foram imersas em solução de pré-infiltração do *kit* de historesina Leica® (50 mL de resina básica e 0,5 g de peróxido de benzoila (ativador)) com etanol 96% (1:1, v/v) por 16-18 horas a 25 °C. Em seguida, amostras foram imersas em solução de infiltração pura durante 24 horas e incluídas em solução de infiltração com Endurecedor Leica® (dimetil sulfoxido) na proporção de 15:1 (v/v). Secções de espessura de 5 µm foram obtidas usando micrótomo de rotação Leica - RM 2125 RT, distendidas em lâminas com uma gota de água e mantidas de 1 a 2 horas à temperatura de 42 ± 2 °C. Após a evaporação da água, as amostras foram coradas com azul de toluidina.³¹

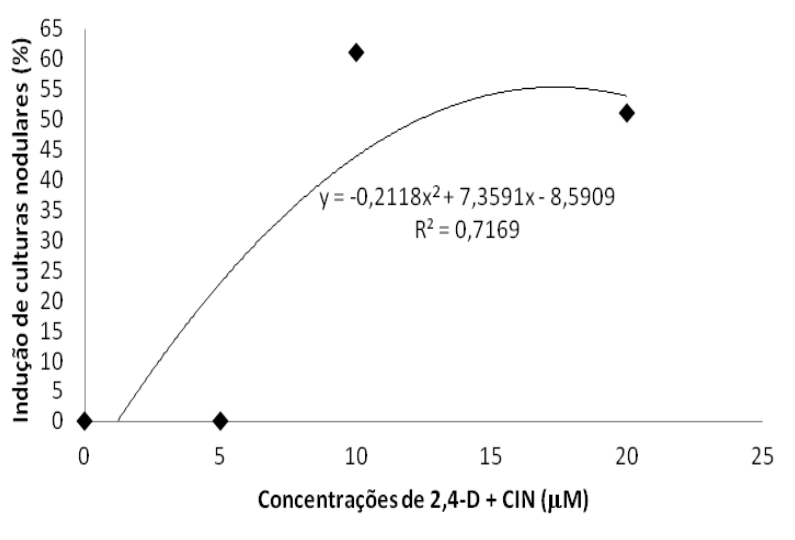
Para as análises ultraestruturais em microscopia eletrônica de transmissão, nódulos organogênicos foram fixados em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M contendo paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% por 12 horas.³² Em seguida, os nódulos foram pós-fixados em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M contendo tetróxido de ósmio a 1% por 4 horas, seguidos de desidratação em solução aquosa de acetona. Posteriormente, os nódulos foram incluídos em resina Spurr.³³ Secções ultrafinas de 70 nm de espessura foram realizadas em ultramicrótomo alocado sobre grades de cobre contrastado com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo. Duas grades foram observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), marca JEOL, modelo JEM-1011 (JEOL Ltda., Tóquio, Japão) a 80 kV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de culturas nodulares foi observada com o uso de 10 e 20 µM de 2,4-D + 1 µM de CIN (Gráfico 1), após 20 dias de cultivo. A análise de regressão entre o percentual de formação de culturas nodulares e as diferentes concentrações de 2,4-D (Gráfico 1) indicou que a formação de nódulos organogênicos apresenta valor máximo teórico com o uso de 17 µM de 2,4-D + 1 µM de

CIN, expresso por meio de uma equação quadrática com coeficiente de determinação (r^2) de 0,71. Os elevados valores de r^2 para o parâmetro testado e teores de regulador de crescimento em *A. setigera* expressam confiabilidade na trajetória, uma vez que para sistemas *in vitro* se consideram elevados os valores de r^2 compreendidos entre 0,5 e 0,9.³⁴

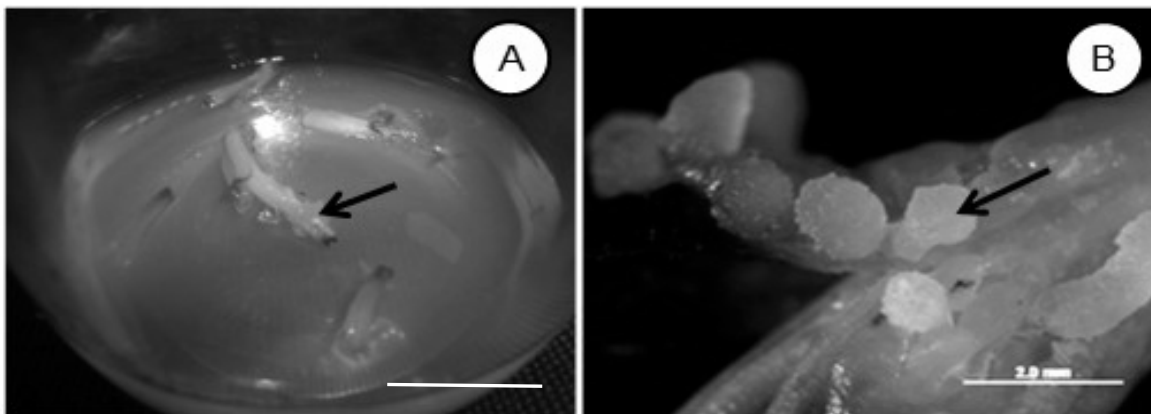
Gráfico 1 – Percentual de indução de culturas nodulares em folhas jovens de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. F. com uso do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) + 1,0 μ M CIN



Fonte: os autores.

Em *A. setigera*, as culturas nodulares com nódulos policêntricos originaram-se na base e ápice foliar com textura compacta, globulares e de coloração amarelada (Figura 2-A e B). Em *Vriesea reitzii*, as culturas nodulares induzidas com 2,4-D também foram observadas com aspecto globular, textura compacta e coloração amarelada, porém, originadas apenas na base foliar.¹⁶ Entretanto, com o uso de ANA + 2-iP como indutores de culturas nodulares em *V. reitzii*, os nódulos apresentaram aspecto friável, com coloração verde-amarelada.¹³

Figura 2 – Culturas nodulares de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. F. sob efeito do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) combinado com cinetina a partir de folhas jovens. A. Folhas jovens seccionadas com nódulos organogênicos (seta) (Barra = 2 cm); B. Detalhe dos nódulos policêntricos (seta) no ápice das folhas jovens (Barra = 2 mm)



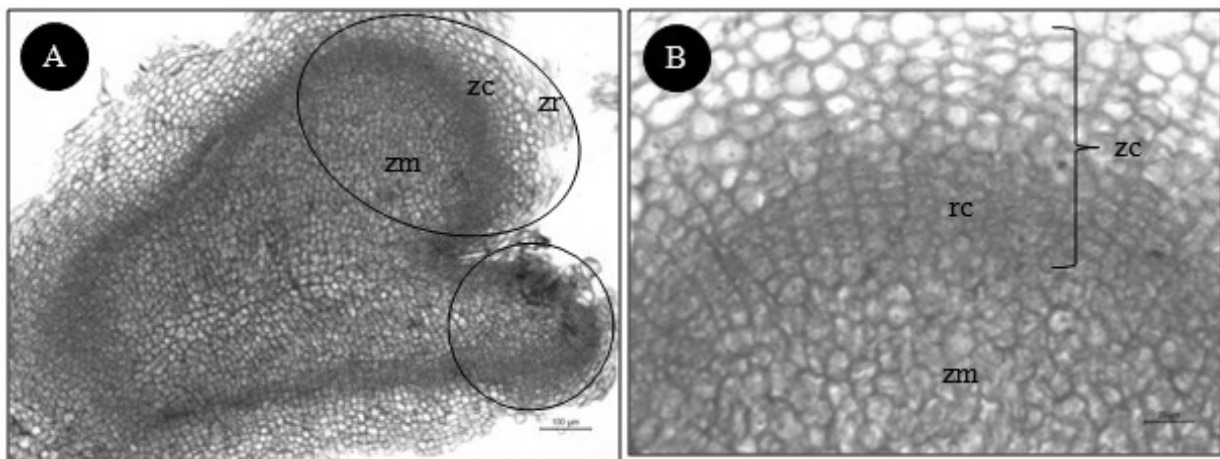
Fonte: os autores.

Nos estudos de indução de culturas nodulares em *Vriesea reitzii* a partir de bases foliares com o uso de 2,4-D combinado com CIN, os nódulos foram induzidos na ausência e na presença de fitoregulador, sendo o maior percentual registrado com 20 μ M.¹⁶ Na indução de brotações adventícias em *clusters*, semelhantes a nódulos, a partir de folhas jovens de *Phoenix dactylifera* (Arecaceae) foram utilizadas baixas concentrações de 2,4-D.²³ Estruturas morfogênicas com elevado potencial de regeneração foram observadas na cultura *in vitro* de bromélias endêmicas do Brasil como em *Vriesea fosteriana*,³⁵ em *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*,³⁶ em *V. reitzii*,^{15,13} e em *Ananas comosus*.¹⁹ Conforme outros autores,¹⁶ esse modelo de padrão morfogênico é recorrente do gênero *Vriesea* e uma característica comum na família Bromeliaceae.

Em outras espécies da família Bromeliaceae, essa rota morfogênica semelhante à obtida neste estudo também foi descrita e mantida em meio basal durante mais de seis meses, como em *Tillandsia eizii*.³⁷ A indução de culturas nodulares a partir de folhas em meio líquido MS suplementado com BAP foi registrada para *Charybdis numidica*.³⁸ Em *P. euphratica*, culturas nodulares organogênicas foram obtidas em meio MS suplementado com BAP e ANA.³⁹ Em *Aechmea fasciata*, a indução de culturas nodulares organogênicas foi obtida com o uso de 2,4-D associado com ANA a partir de explantes florais.²⁷

As análises histológicas dos nódulos organogênicos policêntricos (Figura 3) mostraram a existência de estrutura morfogênica organizada em três zonas, denominadas zona de revestimento (zr), zona cortical (zc) e zona medular (zm). A histologia de nódulos de *Humulus lupulus* L. evidenciou também a organização policêntrica, com zonação de três regiões, denominadas estrutura semelhante à epiderme; região cortical; e centro de organização.²¹ Nos estudos de culturas nodulares de *Vriesea reitzii*¹³ e *Billbergia zebrina*,¹⁸ os nódulos induzidos apresentaram revestimento denominado protoderme, uma vez que foram considerados aglomerados meristemáticos, os quais já diferenciavam brotos. Contudo, as características estruturais de nódulos descritos para *Vriesea reitzii* e *Billbergia zebrina* diferem dos encontrados no presente estudo com *Aechmea setigera*, uma vez que neste existe uma nítida zonação na estrutura dos nódulos policêntricos (Figura 3).

Figura 3 – Secção longitudinal de nódulos organogênicos de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. F. sob efeito do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + 1,0 μ M CIN a partir de folhas jovens. A. Nódulos com zonação histológica (Barra = 100 μ m); B. Detalhe da zona cortical com região cambial (rc) e zona medular (Barra = 25 μ m). Legendas: zona de revestimento (zr); zona cortical (zc); zona medular (zm)



Fonte: os autores.

A zona de revestimento apresenta células com parede celular primária, delgada, com o protoplasto pouco denso e células frouxamente aderidas entre si, denominadas neste trabalho tecido semelhante à periderme. Nódulos organogênicos de *Cichorium intybus* L. evidenciam revestimento também denominado periderme com múltiplas camadas.²⁶ A organização estrutural de nódulos organogênicos, também policêntricos em *Humulus lupulus* L., mostrou um revestimento dado por epiderme.²¹

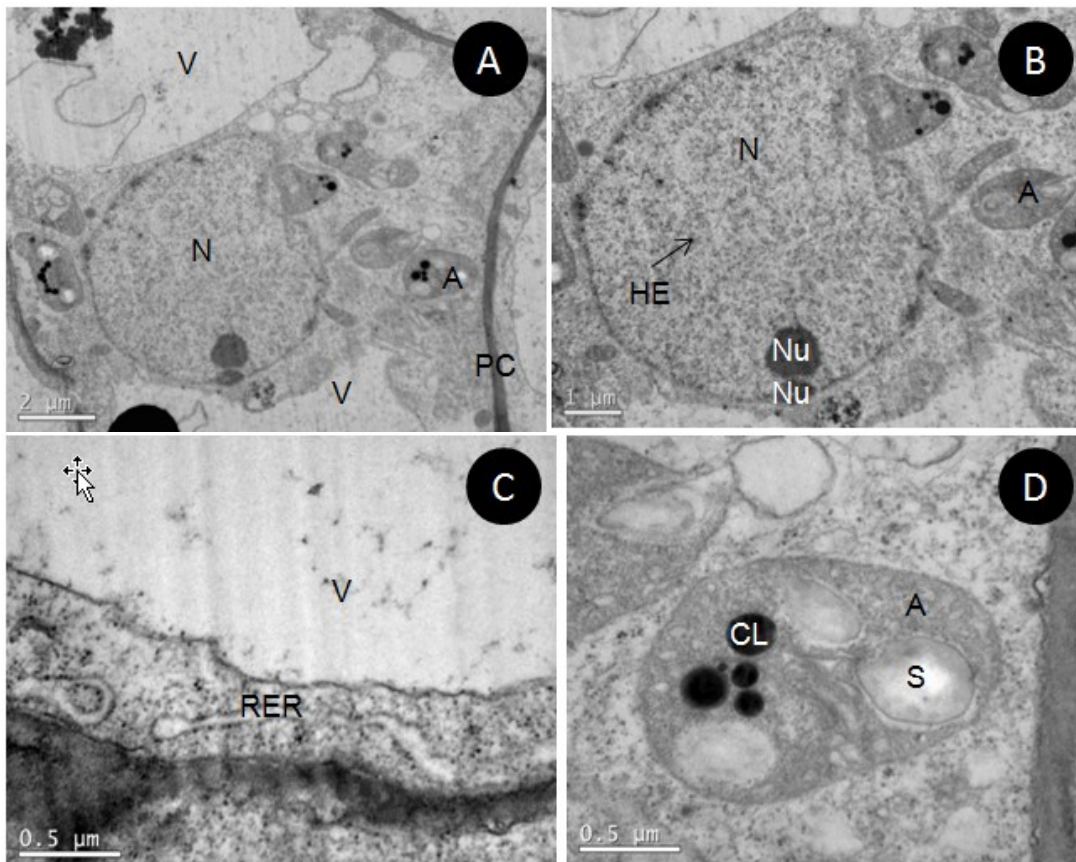
Na zona cortical, região periférica dos nódulos, as células apresentam parede celular primária, delgada, com protoplasto denso, indicando intensa atividade de divisão celular. A histologia de nódulos organogênicos *Cichorium intybus* L.²⁶ e de *Humulus lupulus* L.²¹ também evidenciou uma região cortical, porém denominadas células parenquimáticas.

Na região mais interna da zona cortical observam-se células com formato alongado (paredes periclinais maiores que as anticlinais) em múltiplas camadas, ausência de espaços intercelulares, protoplasto denso e núcleo evidente (Figura 3-B), denominadas neste trabalho zona cambial. A análise ultraestrutural de nódulos de *Cichorium intybus* L. mostrou uma região cambial (meristemática) também central, após 12 dias de cultivo.²⁶ De modo semelhante, os nódulos de *Humulus lupulus* L. organizaram uma região meristemática na zona central.²¹

Na zona medular mais interna ao nódulo, as células apresentam características parenquimáticas, isodiamétricas, parede celular primária delgada, pequenos espaços intercelulares e protoplasto moderadamente denso. Diferentes resultados foram descritos para a região mais interna de nódulos de *Cichorium intybus* L.²⁶ e de *Humulus lupulus* L.,²¹ nos quais células de tecido vascular (xilema) foram observadas.

A análise ultraestrutural de células da região cambial de nódulos organogênicos de *Aechmea setigera* evidenciou a ocorrência de paredes celulares delgadas, e alta relação núcleo/citoplasma (Figura 4-A). O núcleo é proeminente, com visualização de heterocromatina e dois nucléolos (Figura 4-B). O citoplasma é denso, e observam-se as lamelas do retículo endoplasmático rugoso (Figura 4-C). Os amiloplastos são numerosos e apresentam grânulos de amido e corpos de lipídios (Figura 4-D).

Figura 4 – Imagens de microscópio eletrônico de transmissão de células da zona meristemática de culturas nodulares de *Aechmea setigera* Mart. Schult. & Schult. F. A. Núcleo celular (N) proeminente, com vacúolos (V) ex. parede celular (PC) delgada; B. Detalhe do núcleo celular evidenciando as regiões de heterocromatina (HE) e os dois nucléolos (Nu); C. Detalhe do retículo endoplasmático rugoso (RER); D. Detalhe do amiloplasto (A) contendo amido (S) e corpos de lipídios (CL)



Fonte: os autores.

As características celulares descritas nas células da região cambial dos nódulos de *A. setigera* são semelhantes às descritas para as células de meristemas apicais em angiospermas de *Elaeis guineensis*,⁴⁰ de *Zea mays*,⁴¹ de *Allium cepa*,⁴² e da gimnosperma *Araucaria angustifolia*.⁴³ Análises ultraestruturais de nódulos organogênicos de *Cichorium intybus* evidenciam células com intensa atividade de síntese, com numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de golgi,²⁶ semelhantes aos resultados obtidos no presente estudo.

As células meristemáticas são células vegetais com capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação⁴⁴ de um grande número de células com papéis específicos.⁴⁵ A diferenciação está relacionada ao aumento do tamanho da célula e implica especialização fenotípica com base na expressão gênica.⁴⁶

As células meristemáticas apresentam parede celular primária delgada com plasmodesmos conectando e possibilitando a comunicação intercelular, por meio de fatores de transcrição que controlam o desenvolvimento.⁴⁷ No presente trabalho com células meristemáticas dos nódulos de *Aechmea setigera*, as paredes celulares primárias e delgadas foram evidenciadas por microscopia de luz e eletrônica de transmissão, concordando com os resultados descritos para *Elaeis guineensis*⁴⁰ e *Araucaria angustifolia*.⁴³

Conforme outros autores,⁴⁸ o núcleo de células meristemáticas apresenta a forma esférica com vários pequenos nucléolos, e a cromatina disposta na sua maioria como heterocromatina. Ainda, eles relatam que as células meristemáticas não apresentam amiloplastos. Os resultados obtidos para as células da região cambial de nódulos de *A. setigera* estão de acordo com estes autores,⁴⁸ e outros⁴³ para a forma do núcleo, da cromatina e dos nucléolos. Entretanto, em *A. setigera* existem numerosos amiloplastos com grânulos de amido e corpos de lipídios, também observados em meristema apical de *Araucaria angustifolia*.⁴³

4 CONCLUSÃO

O uso do ácido 2,4-D em elevadas concentrações, combinado com 1,0 µM de CIN, induz a formação de nódulos organogênicos a partir de folhas jovens de *Aechmea setigera*. A análise estrutural de nódulos induzidos revelou a organização das zonas de revestimento, cortical e medular. A análise ultraestrutural de células da região cambial revelou a existência de parede celular delgada, núcleo grande com dois nucléolos, grande quantidade de heterocromatina, citoplasma denso, vacúolos, retículo endoplasmático rugoso e amiloplastos com grânulos de amido e corpos de lipídios. Tais características suportam o papel pluripotente dessas células meristemáticas na formação dos nódulos organogênicos.

REFERÊNCIAS

1. Fearnside P. Dams in the Amazon: Belo Monte and Brazil's Hydroelectric Development of the Xingu River Basin. *Environmental Management*. 2006;38:16-27.
2. Ministério do Meio Ambiente. [online]. Brasília, DF; Brasil; 2014. [capturado em 24 out. 2014] Disponível em <http://mma.gov.br/biomas/amazônia/>.
3. Condé TM, Tonini H. Fitossociologia de uma floresta ombrófila densa na Amazônia setentrional, Roraima, Brasil. *Acta Amazonica*. 2013;43(3):247-60.
4. Benzing DH. *Vascular epiphytes: General biology and related biota*. Cambridge: Univ. Press, Cambridge; 1990.
5. Martinelli G, Moraes MA. *Livro vermelho da flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2013.
6. Luther HE. *An alphabetic list of bromeliad binomials*. The Marie Selby botanical gardens. 11th ed. Sarasota: Bromeliad Society International; 2008.
7. Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee Riina B, Schulte RK, Horres Gonsiska RPA, Jabaily RS. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*. 2011;98(5):872-95.

8. Nara AK, Webber AC. Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixio da Amazônia Central. *Acta Amazonica*. 2002;32(4):571-88.
9. Quaresma AC, Jardim MA. Diversidade de bromeliáceas epífitas na área de Proteção Ambiental Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 2012;26(2):290-4.
10. Ribeiro JELS, Hopkins MJG, Vicentini A, Sothers CA, Costa MAS, Brito JM. et al. Flora da reserva ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 1999.
11. Flora Brasiliensis. [online]. São Paulo; Brasil; 1982. [capturado em 02 out. 2013] Disponível em http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=21355.
12. Feuser S, Meler K, Daquinta M, Guerra MP, Nodari RO. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2003;72:221-7.
13. Dal Vesco L, Guerra MP. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. *Scientia Horticulturae*. 2010;125:748-55.
14. Guerra MP, Dal Vesco LL. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. 2010;589:47-66.
15. Rech Filho A, Dal Vesco LL, Nodari RO, Lischka RW, Müller CV, Guerra MP. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity & Conservation*. 2005;14:1799-1808.
16. Alves GM, Dal Vesco LL, Guerra MP. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulture*. 2006;110:204-7.
17. Rech Filho A, Dal Vesco LL, Guerra MP. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from Atlantic forest. *Ciência Rural*. 2009;39:909-12.
18. Dal Vesco LL, Stefenon VM, Welter LJ, Scherer RF, Guerra MP. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. *Scientia Horticulturae*. 2011; 128:515-22.
19. Scherer RF, Garcia AC, Fraga HPF, Dal Vesco LL, Steinmacher D, Guerra MP. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*. 2013;151:38-45.
20. Pieron S, Belaizi M, Boxus P. Scheme for rapid clonal propagation of *Cichorium intybus* L. through nodule culture. *Acta Horticulture, Leuven*. 1992;19:285-9.
21. Batista D, Ascensao L, Sousa MJ, Pais MS. Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. *Eroica* in liquid medium from organogenic nodule cultures. *Plant Science*. 2000;151:47-57.

22. Te Chato S, Lim, M. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from in vitro-derived leaf explants. *Scientia Horticulturae*. 2000;86:291-8.
23. Fki L, Bouaziz N, Kriaa W, Benjemaa-Masmoudi R, Gargouri-Bouزيد R, Rival A. et al. Multiple bud cultures of ‘Barhee’ date palm (*Phoenix dactylifera*) and physiological status of regenerated plants. *Journal of Plant Physiology*. 2011;168:1694-1700.
24. George EF, Debergh PC. Micropropagation: uses and methods. In: George EF, Hall MA, De Klerk G-J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer; 2008.
25. Hunault G. Recherches sur les comportements des fragments d'organes et des tissus de monocotyledones cultivés *in vitro* II. Etude du cas de quelques Agavaceae. *Rev. Cytol. Biol. Veget. Bot.* 1979;2:21-66.
26. Pieron S, Boxus P, Dekegel D. Histological study of nodule morphogenesis from *Cichorium intybus* L. leaves cultivated in vitro. *Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 1998;34:87-98.
27. Huang PL, Liao LJ, Tsai CC, Liu, ZH. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2011;105:73-8.
28. HOSOKI T, ASAHIRA T. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. *HortScience*. 1980;15:603-4.
29. Murashige T, Skoog F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15:473-97.
30. Morel GM, Wetmore RH. Tissue culture of monocotyledons *American Journal of Botany*. 1951;38:138-40.
31. O'Brien TP, Feder N, Mccully ME. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 1965;59:368-73.
32. Schmidt EC, Scariot LA, Rover T, Bouzon ZL. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron*. 2009;40:860-9.
33. Spurr AR. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*. 1969;26:31-43.
34. Compton M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 1994;37:217-42.
35. Mercier H, Kerbauy GB. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: Bajaj YPS. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 1997;40:43-57.

36. Alves GM, Guerra MP. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of Bromeliad Society*. 2001;51:202-12.
37. Pickens KA, Wolf J, Affolter JM, Wetzstein HY. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *Vitro Cellular and Development Biology*. 2006;42:348-53.
38. Kongbangkerd A, Kopf A, Allacher P, Wawrosh C, Kopp B. Micropropagation of squill (*Charybdis numidica*) through nodule culture. *Plant Cell Reports*. 2005;23:673-7.
39. Ferreira S, Batista D, Serrazina S, Pais MS. Morphogenesis induction and organogenic nodule differentiation in *Populus euphratica* Oliv. leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2009;96:35-43.
40. Jouannic S, Lartaud M, Hervé J, Collin M, Orioux Y, Verdeil JL. The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; *Arecaceae*) developmental progression and dynamics. *Annals of Botany*. 2011;108:1477-87.
41. Marín-Méndez W, Sánchez-Chacón E, Gatica-Arias AM, Ramírez-Fonseca P, Freer-Bustamante E, Valdez-Melara M. Ultrastructure and histology of organogenesis induced from shoot tips of maize (*Zea mays*, *Poaceae*). *Revista de Biología Tropical*. 2009;57:129-39.
42. Bennici A, Tani C. Ultrastructural effects of salinity in *Nicotiana bigelovii* var. *bigelovii* callus and *Allium cepa* roots. *Caryologia*. 2009;62(2):124-33.
43. Rogge-Renner GD, Steiner N, Schmidt EC, Bouzon ZL, Farias F, Guerra MP. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. *Protoplasma*; 2012.
44. Singh MB, Bhalla PL. Plant stem cells carve their own niche. *Trends Plant Science*. 2006;11:241-6.
45. Nieuwland J, Scofield S, Murray JAH. Control of division and differentiation of plant stem cells and their derivatives. *Seminar in Cell & Developmental Biology*. 2009;20:1134-42.
46. Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Current Opinion in Cell Biology, Missouri*, (16): 700-7.
47. Kurata T, Okada K, Wada, T. Intercellular movement of transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005;8:600-5.
48. Verdeil J-L, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Science*. 2007;12(6):245-252.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo auxílio financeiro mediante o edital Universal processo n. 475017/2011-0.

Recebido em 07 de abril de 2014
Aceito em 29 de outubro de 2014