

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GLAISE MARA ALVES

MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE
Vriesea reitzii e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra.

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis.

FLORIANÓPOLIS
2000

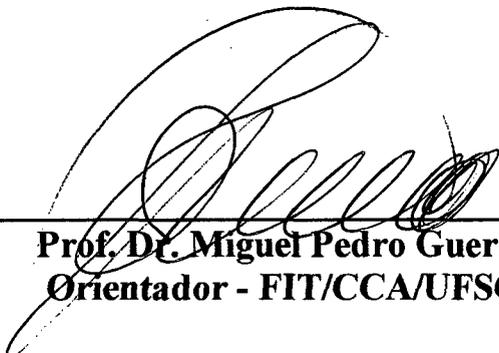
**"MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE *VRISEA REITZII* E
VRISEA FRIBURGENSIS VAR. *PALUDOSA*"**

POR

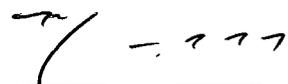
GLAISE MARA ALVES

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

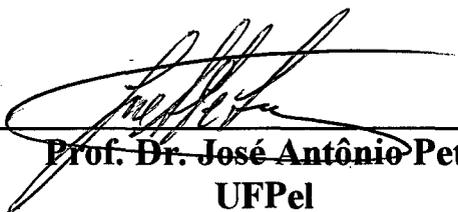
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Orientador - FIT/CCA/UFSC



Prof. Mauricio Sedrez dos Reis
FIT/CCA/UFSC



Prof. Dr. José Antônio Peters
UFPeI



Profa. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, março de 2000

Aos professores Miguel Pedro Guerra e Maurício Sedrez dos Reis, e àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos.

"Charles Plumier, explorador francês, viajava pela região das Antilhas, no final do século XVIII, quando se deparou com um conjunto de plantas invulgares, que os nativos chamavam de karatas. Retornando a sua terra natal, decidiu dar a elas um outro nome "mais digno e expressivo" do que aquele tão "primitivo". Aproveitou então, a oportunidade para homenagear o botânico sueco Olaf Bromel. Em 1753, Lineu – criador do moderno sistema binomial de nomenclatura científica animal e vegetal – oficializou o nome dado por Plumier às plantas, estabelecendo assim o gênero Bromelia."

"Nós amamos nas bromélias o caráter, por assim dizer o clássico, dos seus contornos; a sua forma é de uma ânfora, de um vaso grego ou de uma roseta; suas folhas descrevem curvas cometas, seus tecidos são firmes e sua superfície é freqüentemente ornada com zebruras ou coloridos diversos; algumas defendem seus frutos com armas aceradas. Suas flores são quase sempre atraentes e sempre de longa duração. Têm belos enfeites e nada pediram à perfumaria..."

(Eduardo Morren, botânico belga, enfeitado, como seus contemporâneos europeus, pela beleza rara das bromélias)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ASPECTOS DA MORFOGÊNE IN VITRO.....	8
1.2. MICROPROPAGAÇÃO EM BROMELLÁCEAS.....	12
1.3. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	15
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	17
2.2. GERAL.....	17
2.3. ESPECÍFICOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4. FORMAÇÃO DE MASSAS CELULARES EMBRIOGÊNICAS EM BASES FOLIARES DE <i>VRIESEA REITZII</i>.....	20
4.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5. MULTIPLICAÇÃO DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i>, VIA ORGANOGÊNESE DIRETA, EM SISTEMA CONVENCIONAL E EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	26
5.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.2.1. Eficiência do sistema de imersão temporária em relação ao sistema convencional na micropropagação de <i>Vriesea friburgensis</i> var. <i>paludosa</i>	31
6. MICROPROPAGAÇÃO DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> A PARTIR DE MICROGEMAS.....	35
6.1. MULTIPLICAÇÃO DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> A PARTIR DE MICROGEMAS.....	35
6.1.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
6.1.2. RESULTADOS.....	36
6.2. FORMAÇÃO DE MASSAS CELULARES EMBRIOGÊNICAS EM MICROGEMAS DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i>	37
6.2.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
6.2.2. RESULTADOS.....	37
6.3. MULTIPLICAÇÃO DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> A PARTIR DE MICROGEMAS, EM RESPOSTA À DISTINTAS COMBINAÇÕES DE FITOREGULADORES.....	39
6.3.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
6.3.2. RESULTADOS.....	39
6.4. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> IN VITRO.....	41
6.4.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	41

6.4.2. RESULTADOS.....	41
6.5. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA BASAL ISENTO DE FITOREGULADOR.....	43
6.5.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
6.5.2. RESULTADOS.....	43
6.6. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA BASAL SUPLEMENTADO COM ANA.....	45
6.6.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
6.6.2. RESULTADOS.....	45
6.7. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA BASAL SUPLEMENTADO COM AG ₃	47
6.7.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
6.7.2. RESULTADOS.....	47
6.8. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA BASAL SUPLEMENTADO COM ANA E BAP.....	49
6.8.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
6.8.2. RESULTADOS.....	49
6.9. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA BASAL SUPLEMENTADO COM KIN.....	51
6.9.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
6.9.2. RESULTADOS.....	51
6.10. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA BASAL SUPLEMENTADO COM 2IP.....	53
6.10.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
6.10.2. RESULTADOS.....	53
6.11. DISCUSSÃO – ASPECTOS GERAIS DA MORFOGÊNESE E MICROPROPAGAÇÃO DE MICROGEMAS.....	55
7. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO NATURAL DE <i>VRIESEA FRIBURGENSIS</i> VAR. <i>PALUDOSA</i> POR MARCADORES ALOZÍMICOS.....	63
7.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
8. SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	71
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	72
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
11. ANEXO I – RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA.....	80
12. ANEXO II – DADOS ORIGINAIS.....	86

RESUMO

As bromélias são subsistemas ecológicos bastante amplos, contribuindo fortemente para a manutenção do equilíbrio em ecossistemas florestais. No Brasil a maior ocorrência de bromélias situa-se no domínio da Mata Atlântica, cujo processo de devastação aliado ao endemismo, ameaça de extinção um grande número de espécies. Técnicas de cultura de tecidos vegetais e caracterização genética são importantes ferramentas para a propagação e conservação de bromélias. Três sistemas de propagação foram empregados para o desenvolvimento *in vitro* de duas bromeliáceas do gênero *Vriesea*. No primeiro, bases foliares de *Vriesea reitzii* foram submetidas à tratamentos compostos por 2,4-D e KIN, a fim de obter-se a indução de massas celulares com características embriogênicas, e à tratamentos compostos por BAP, KIN e 2iP, visando a regeneração de brotos a partir dessas massas celulares. No segundo, procurou-se comparar a eficiência de dois sistemas de micropropagação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, via organogênese. Por fim, microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* foram submetidas à distintos fitoreguladores, ANA, 2,4-D, BAP, KIN e 2iP, para a multiplicação, e ao AG₃ para a obtenção de brotos a partir dessas microgemas. O meio de cultura basal utilizado em todos os experimentos, foi composto pela formulação salina Murashige & Skoog (MS) (1962) suplementa com sacarose (3,0 %, p/v) e vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951). O tratamento composto por 2,4-D (20,0 µM) e KIN (1,0 µM) promoveu a indução de massas celulares em 90,62 % dos explantes foliares de *Vriesea reitzii*, que não foram convertidas em plantas. O sistema de imersão temporária mostrou-se pouco eficiente quando empregado na micropropagação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, considerando-se os resultados obtidos no cultivo de outras espécies, sendo que, neste trabalho, o melhor tratamento composto por ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM), promoveu uma taxa de proliferação de brotos de 16,66. No sistema convencional, os tratamentos com PBZ em sua composição promoveram as maiores taxas de proliferação: 20,10 brotos para o tratamento composto por ANA (2,0 µM), BAP (4,0 µM) e PBZ (3,0 µM), e 26,11 brotos para o tratamento PBZ (3,0 µM). Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* submetidas aos fitoreguladores 2,4-D, ANA, BAP, KIN e 2iP, e ao meio de cultura basal isento desses, para a multiplicação, à diferentes concentrações de AG₃ para alongamento, mostraram nos melhores tratamentos o desenvolvimento de, no mínimo, 170 brotos por grama de inóculo (microgemas). Uma população natural de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, foi caracterizada geneticamente, por análise de isoenzimas, observando-se os seguintes aspectos: ocorrência de 70,0 % de polimorfismo nos 10 locos analisados; número médio de 2,3 alelos por loco; valores de heterozigosidade média observada e esperada foram, respectivamente, 0,324 e 0,226. O índice de fixação encontrado foi de -0,053, revelando um excesso de heterozigotos.

ABSTRACT

Bromeliads are complex ecological systems, contributing to the maintenance of the forest ecosystems. In Brazil the highest occurrence of Bromeliads, most of them endemic, is the Atlantic Forest domain. These ecosystem is endangered as result of deforestation practices. Tissue culture and genetic population techniques are valuable tools to the genetic characterization, mass propagation and germplasm conservation of these species. Three tissue culture systems were employed to the micropropagation of two Bromeliads. In the first basal leaves of plantlets of *Vriesea reitzii* were incubated in basal MS culture medium, supplemented with Morel vitamins, 2,4-D and KIN, aiming at the induction of embryogenic cell complexes. In the sequence these cultures were subcultured to MS culture medium supplemented with different levels of BAP, KIN and 2iP, aiming at the regeneration of plantlets. In the second it was compared the efficiency of two systems in the micropropagation by organogenesis of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*. In the third microbuds of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* were incubated in MS basal culture medium supplemented with different levels of NAA, 2,4-D, BAP, KIN e 2iP, in the multiplication stage, and with GA₃ to the plantlet conversion. In all experiments the basal culture medium was the MS saline formulation, Sucrose (3.0 %), and Morel vitamins. Basal culture medium supplemented with 2,4-D (20,0 µM) and KIN (1,0 µM) resulted in the induction of morphogenic cell complexes in 90,62% of basal leaves explants of *Vriesea reitzii*. These cell complexes resulted in the formation of microbuds that did not converted in plantlets. The temporary immersion system showed low efficiency for the micropropagation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, when compared with the results observed in other species. In the present work the best treatment (NAA 2,0 µM and BAP 4,0 µM), resulted in a mean bud regenerative rate of 16,66. In the conventional stationary liquid system the culture media supplemented with NAA (2,0 µM), BAP (4,0 µM) e PBZ (3,0 µM) and with PBZ (3,0 µM) resulted in a mean bud regenerative rate of 20,10, and 26,11, respectively. Microbuds of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivated in the multiplication stage in basal culture media supplemented with 2,4-D, NAA, BAP, KIN e 2iP, and free of growth regulators as well cultivated in culture medium supplemented with different levels of GA₃ for elongation resulted in the development of a minimum mean value of 170 plantlets/g of microbuds. A natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* was evaluated genetically by allozymic loci. It was observed the occurrence of 70% of polymorphism in ten loci. The average number of allele per locus was 2.3. The values for heterozygosity observed and estimated were 0,234 e 0,226, respectively. The fixation index was -0,053, revealing an excess of heterozygotes.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2IP – 2-isopenteniladenina

AG₃ – Ácido giberélico

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – 6-benzilaminopurina

CV (%) – Coeficiente de variação

KIN – Cinetina

MS – Murashige & Skoog, 1962

PBZ - Paclobutrazol

1. INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é composta por aproximadamente 2500 espécies, todas elas nativas do Continente Americano, com exceção de uma espécie, *Pitcairnia feliciana*, que ocorre na África. Em termos taxonômicos, as bromélias estão divididas em três subfamílias: Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae, baseando-se em análises comparativas entre as estruturas reprodutivas, as quais são consideradas conservativas, isto é, as alterações destas são menos influenciadas pelo meio ambiente do que as estruturas vegetativas (Padilha, 1978).

As bromeliáceas apresentam espécies bem especializadas, adaptadas à ambientes oligotróficos e áridos. As diferentes linhas evolutivas seguidas pelos membros da família Bromeliaceae, refletiriam a grande plasticidade fisiológica através da qual a seleção pode operar (Benzing, 1987). Evolutivamente, várias espécies de bromélias vêm alcançando o hábito epífita mais especializado, reduzindo seus sistemas caulinares e radiculares. Algumas características adquiridas pela parte aérea parecem ter exercido enorme influência na aquisição da independência do solo. A disposição peculiar das folhas no caule com sobreposição parcial entre elas, formando o que se denominou de tanque, é uma das características mais relevantes, encontradas hoje em cerca de 50 % das bromeliáceas. Aliado a isso, a presença de tricomas absorventes nas folhas e a aquisição de tecidos acumuladores de água presentes nas folhas, conferindo um certo grau de succulência a elas, foram fatores determinantes no desenvolvimento do hábito epífita (Benzing, 1990). O crescimento da parte aérea é limitado a um curtíssimo caule, que sustenta uma pequena produção de raízes e o desenvolvimento de gemas axilares, geralmente no período de pós-florescimento. Com relação ao sistema radicular há uma profunda modificação de função, passando de uma situação em que é predominantemente ativo na absorção de água e sais para a fixação do organismo à planta hospedeira ou à um substrato. Assim, a divisão das atividades convencionais entre raízes e parte aérea foi profundamente alterada nessas espécies epífitas. A parte aérea adquiriu funções nutricionais, englobando a absorção de água e minerais, adicionalmente às funções fotossintética e reprodutiva (Benzing, 1990).

A maior parte dos indivíduos das subfamília Pitcairnioideae e algumas espécies de Bromelioideae adquirem os minerais provenientes do solo como qualquer outra espécie terrestre. Associações entre fungos e bromélias parecem não ser muito frequentes, embora

em algumas espécies do gênero *Bromelia* tenha sido detectada a presença de micorrizas (Benzing, 1990). Já as bromélias formadoras de tanque são capazes de adquirir elementos minerais, em parte pelo sistema radicular, mas principalmente por absorção nas próprias folhas. No caso das epífitas, a planta hospedeira é importante para a fixação, apesar de indiretamente contribuir para a riqueza de nutrientes dos tanques. Isso acontece na medida em que a água da chuva, ao passar pela planta hospedeira, retira vários tipos de íons e até mesmo aminoácidos que são levados pela água até serem acumulados nas cisternas dessas bromélias formadoras de tanques (Benzing, 1973).

Com relação à nutrição da subfamília Tillandsioideae, a capacidade de absorção dos tricomas foliares dessas espécies é grandemente aumentada em relação à outras espécies. Através de experimentos utilizando aminoácidos marcados radiativamente, observou-se que as células vivas dos tricomas tornam-se substancialmente marcadas em relação as células epidérmicas adjacentes (Benzing, 1973). Além disso, registrou-se que folhas de *Tillandsia* absorvem mais intensamente cálcio, fósforo e sulfatos que os tecidos foliares de *Catopsis nutans*, uma espécie formadora de tanque, demonstrando maior efetividade da parte aérea das plantas epífitas atmosféricas na absorção de sais (Benzing & Pridgeon, 1983). Os tricomas da subfamília Tillandsioideae são os mais especializados comparativamente aos das outras duas subfamílias, constituindo um conjunto de células mortas e vivas. Estes podem modificar sua posição, elevando-se ou, ao contrário, justapondo-se à superfície celular. Quando não há umidade em excesso no ar, essas células subiriam, agindo como um dissipador de energia luminosa, ao refletir grande parte dos raios solares. Já na presença de maior umidade relativa, elas seriam preenchidas por água, em um processo físico de embebição, ajustando-se paralelamente à superfície foliar. A água seria então conduzida às células vivas, contendo muitas mitocôndrias, o que sugere uma ativa participação dessas células nos processos de absorção de nutrientes. Por processos osmóticos, a água alcançaria os tecidos foliares mais internos. O tom prateado característico de muitas bromélias é resultante da densa cobertura foliar por tricomas, os quais agem na diminuição da transpiração, reduzindo consideravelmente a temperatura da superfície foliar. Esses aspectos são de extrema relevância para as espécies que habitam as regiões mais áridas das formações vegetais, sendo conhecidas como epífitas atmosféricas (Benzing, 1978).

Várias espécies de *Tillandsia* têm sido empregadas como plantas indicadoras da

poluição atmosférica, principalmente por metais. Duas características contribuem efetivamente para esta utilização: a grande absorção de íons atmosféricos empregados na sua própria nutrição, mas que podem ser acumulados, e a natureza não específica desta absorção, acarretando muitas vezes níveis tóxicos de alguns desses íons (Benzing, 1990).

Benzing (1974) considerou que a aplicação de fertilizantes não acelera significativamente o crescimento de bromélias atmosféricas cultivadas em casa de vegetação. O desenvolvimento lento é uma adaptação essencial dessas plantas à sobrevivência em ambientes oligotróficos, representando uma economia significativa na utilização dos recursos nutricionais na síntese de matéria vegetal.

As bromélias são universos miniaturizados, podendo ser encontradas em suas rosetas, as mais variadas formas de vida. Suas cisternas desempenham a função de charcos e lagos penseis, com microflora e microfauna especiais, bem como macroflora e macrofauna. Tanto a microflora como a microfauna bromelícolas são riquíssimas com muitas novidades para a ciência, mesmo em nível de gêneros novos. Observou-se uma útil coabitação entre bromeliáceas e orquidáceas (*Laelia purpurata* Lindl., *Cattleya intermedia* Grah.). Desenvolvendo-se lado a lado, as orquídeas introduzem suas raízes entre as folhas das bromeliáceas onde têm suprimento perene de água e alimentos. Mais dependentes ainda da umidade e dos nutrientes das cisternas das bromélias são algumas espécies de aráceas. Com frequência observa-se, no domínio da Mata Atlântica em Santa Catarina, exemplares jovens de *Philodendron selloum* e *P. melanorrhizum* se desenvolvendo nas rosetas de espécies de *Vriesea*, *Aechmea*, *Nidularium*, *Neoregelia*, *Canistrum*, *Wittrockia* e *Hohenbergia*, tanto que têm-se a convicção de que normalmente a germinação e o desenvolvimento das plantas jovens, desta aráceas, dependem como que, exclusivamente, do meio úmido dos terrários e aquários das bromélias. Pequenas cobras, pererecas, lagartixas, caranguejos de água doce e salgada, aranhas, escorpiões, centopéias, libélulas, grilos, gafanhotos, besouros, percevejos aquáticos, formigas de diversas espécies e lesmas, são encontrados seguidamente no meio bromelícola (Reitz, 1983).

A distribuição das bromeliáceas depende essencialmente de fatores climáticos. Ao longo do litoral do estado de Santa Catarina, dominado pela floresta pluvial atlântica, a temperatura anual cai 2°C no sentido norte-sul, e a precipitação média é reduzida em 500 mm no mesmo sentido. Sendo influenciados pelo macroclima, os gêneros de caráter mais

tropical vão desaparecendo do norte para o sul, à medida que a temperatura e o nível de precipitação declinam. Muitas bromélias encontram em Santa Catarina o limite sul para sua dispersão. Das 114 espécies e variedades que encontram-se no norte do estado, 94 chegam à serra de Tijucas, 62 vão até a serra do Tabuleiro e 41 chegam à divisa sul de Santa Catarina (Reitz, 1983).

O gênero *Vriesea*, representado neste trabalho por *Vriesea reitzii* e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, compreende 257 espécies distribuídas nas três Américas desde o México e Cuba até o sul do Brasil e nordeste da Argentina (Smith & Downs, 1977). Em Santa Catarina foram encontradas 31 espécies nativas do gênero *Vriesea*, compondo o gênero mais numeroso, ocorrendo em todo o Estado (Reitz, 1983).

Devido a fatores climáticos, a Amazônia apresenta relativa escassez de bromélias, com apenas 64 espécies de 14 gêneros. A longa duração da estação seca, de maio a outubro, impede a germinação de sementes e a sobrevivência de espécimes jovens, e a estação chuvosa inibe a dispersão dessas plantas (Reitz, 1983).

As bromélias ainda sofrem influência do microclima para distribuírem-se no interior da floresta, de acordo com a luminosidade e umidade relativa do ar. São identificados quatro níveis de fixação, do solo à copa das árvores. No primeiro nível, o solo, onde a luminosidade é pouca e a umidade relativa do ar é elevada, habitam as bromélias esciófilas, formando algumas vezes extensos tapetes. Estas são responsáveis, em parte, pela umidade do ambiente florestal, devido à evaporação da água que armazenam. No segundo nível, o do médio tronco das árvores, arvoretas e arbustos, encontram-se as espécies médio-esciófilas. Neste nível, entre um e oito metros acima do solo, ainda há grande umidade e luminosidade reduzida. O terceiro nível abriga as bromélias que demandam intensidade média de luz e mais umidade de que as espécies heliófilas, nas bases dos galhos que formam as copas das árvores, oito a vinte metros acima do solo. Neste nível encontra-se a maior variedade de bromélias, entre elas as de maior porte. O quarto nível abriga as espécies heliófilas, acima de vinte metros do solo, na copa das árvores, onde a luminosidade é intensa e a umidade relativa do ar é consideravelmente menor (Reitz, 1983).

Em estudo realizado pela Conservation International sobre a diversidade mundial, a Mata Atlântica ocupa o quarto lugar em diversidade de plantas, com vinte mil espécies das quais seis mil são endêmicas (que correspondem à 3% das espécies endêmicas do mundo),

apesar da destruição de 92,5% de seu 1,2 milhão de quilômetros quadrados originais. A região foi selecionada por apresentar menos de 30% de sua cobertura vegetal original, apresentando índices elevados de espécies de mamíferos, anfíbios, répteis aves e plantas (Heywood, 1995). Se por um lado a Mata Atlântica é classificada entre os 25 lugares do mundo de maior importância ecológica, pela sua diversidade de espécies, por outro lado possui hoje apenas 7,5% de sua área original que continua sendo devastada em larga escala pela ocupação humana.

Na primeira metade do século XX, a crescente incidência da malária em Santa Catarina afetou todas as bacias hidrográficas dos rios que vertem para o oceano Atlântico, atingindo 29 municípios que reuniam a grande maioria da população agrícola e praticamente todo complexo industrial do Estado (Pinotti *et al.*, 1947).

Devido a sua capacidade de armazenar água, como exemplo têm-se a *Vriesea gigantea* que chega a ter quatro litros de água na sua roseta foliar, possuindo significativo papel ecológico, em 1903, as bromélias foram detectadas, por Adolfo Lutz, como criadouros do agente transmissor da malária, o anofelino do subgênero *Kerteszia*, que em Santa Catarina chegou a atingir, nas décadas de 40 e 50, cerca de um milhão de pessoas, registrando-se a maior incidência da doença no país (Reitz, 1985). Uma vez que a malária em Santa Catarina era transmitida por um mosquito anofelino, hóspede das bromélias, o problema era caracterizado, pela maioria dos envolvidos, como nítida e exclusivamente ecológico. Com base no pressuposto de que há uma estreita relação entre a flora e a fauna de cada região e que vivem em equilíbrio biológico, empreendeu-se um dos maiores levantamentos fitossociológico já feitos na América do Sul. O número de bromélias por unidade de área era surpreendente, tanto na planície como na restinga do litoral catarinense, onde havia regiões com 11 a 13 exemplares por metro quadrado, densidade equivalente a um tapete contínuo de bromélias (Reitz, 1983). Porém, em detrimento da alta endemia de malária em 1946-60 foram deflagradas duas campanhas de erradicação dos gravatás, assim conhecidas as bromélias neste Estado: uma consistia na retirada manual dessas plantas e a outra no desmatamento. Esse feito resultou em consequências ecológicas altamente desastrosas, para as bromeliáceas e para toda comunidade florestal. O número de bromélias destruídas chegou a 410 milhões e o desmatamento feito num raio de 1500 metros na

periferia das cidades atingidas pela malária, atingiu 27,3 milhões metros quadrados (Reitz, 1983).

O endemismo é uma característica marcante das bromeliáceas. Embora existam espécies espalhadas por extensas faixas de terra, outras contudo, possuem suas populações confinadas em áreas restritas ou isoladas (Leme, 1984). Atualmente essas espécies encontram-se ameaçadas pela ação indiscriminada do homem sobre o meio ambiente. Espécies não endêmicas também sofrem ameaças podendo ter suas populações reduzidas, em determinadas regiões, afetando o complexo vegetacional em que habitam, já que possuem importante papel ecológico coabitando com inúmeras espécies da flora e fauna.

As populações vegetais de pequenas ilhas são mais vulneráveis do que em grandes extensões de terra, devido à seus relativamente altos índices de endemismo. A modificação do habitat ou a introdução de espécies exóticas de animais ou plantas, pode tornar, em pouco tempo, populações estáveis em populações instáveis e ameaçadas de extinção, tornando-se necessário a implantação de programas de conservação dessas espécies (Fay, 1992). Programas de conservação de plantas envolvem diferentes estratégias incluindo estudos genéticos e ecológicos de plantas, manejo de habitat, e conservação *ex situ* à campo, em bancos de genes e sementes. Em adição, são utilizadas técnicas de cultura de tecidos vegetais. A aplicabilidade dessas técnicas relaciona-se com a obtenção de mudas uniformes de alta qualidade e livres de doenças, permitindo a multiplicação rápida e geneticamente confiável de novas cultivares e híbridos. Em termos ecológicos, pode ser utilizada na preservação e propagação de espécies raras ou ameaçadas (Zornig, 1996).

Métodos *in vitro* para a conservação de plantas são muito similares aos aplicados à micropropagação de produtos agrícolas. Em alguns casos a quantidade de material vegetal disponível é muito pequena, podendo inviabilizar a utilização de alguns métodos. As sementes são o material vegetal preferido para a propagação, por ser possível a manutenção de sua base genética. Quando trabalha-se com plantas cuja conservação é importante, evita-se utilizar métodos que possam induzir variação somaclonal como calos e suspensões celulares, procurando-se manter a integridade genética da cultura. Contudo, em populações reduzidas a variação somaclonal pode ser sugerida como uma maneira de gerar um novo vigor dentro da população (Bramwell, 1990; Jacobsen & Dohmen, 1990; Fay, 1992).

A propagação das bromélias é feita por sementes ou por afillhos. No primeiro caso o processo sexual leva à recombinação genética. No segundo, a propagação assexuada garante a fixação das características de um dado genótipo. Florescendo apenas uma vez em seu ciclo vital, o processo de auto-fecundação praticamente não ocorre nas bromeliáceas, pois as flores geralmente são protândricas, havendo na maioria dos casos polinização por insetos e pássaros. As sementes dos frutos tipo baga, envoltas em mucilagem, são disseminadas por animais e as sementes das cápsulas possuem estruturas pilosas sendo disseminadas pelo vento. Para que o ciclo vital se complete, antes do término do período de floração e frutificação, brotos são emitidos a partir da base caulinar da planta-mãe, que entra em senescência (Reitz, 1983).

O Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC vem, desde 1984, desenvolvendo pesquisas na área de micropropagação de espécies florestais e frutíferas. Desde 1987, este laboratório vem aperfeiçoando protocolos regenerativos de bromeliáceas. Além disto, o Núcleo de Pesquisas em Espécies Florestais da UFSC, vem, desde 1979, desenvolvendo pesquisas com o manejo sustentado da Mata Atlântica, visando o uso racional múltiplo da floresta. O conceito de manejo sustentado parte do pressuposto de que é possível explorar a floresta indefinidamente sem sua devastação, através da definição de parâmetros baseados na autoecologia das espécies, das quais as bromeliáceas são componentes importantes pois tratam-se de subsistemas ecológicos, bastante complexos, contribuindo fortemente para a manutenção do equilíbrio em ecossistemas florestais.

1.1. ASPECTOS DA MORFOGÊNESE *IN VITRO*

A cultura de tecidos como técnica consiste em isolar uma parte da planta (explante) e proporcionar-lhe artificialmente, sob condições assépticas, os recursos físicos e químicos apropriados a fim de que as células expressem seu potencial intrínseco ou induzido para regenerar outras células, tecidos e órgãos (Villalobos & Thorpe, 1991).

Em 1902, Haberlandt propôs a teoria da totipotencialidade, em que todas as células vegetais tem potencial para regenerar plantas completas. White (1939) obteve a indução de gemas adventícias *in vitro* a partir de calos de *Nicotiana glauca* x *N. longsdorfii* e Nobencourt (1939) obteve raízes adventícias de *Daucus carota*. Estes experimentos deram respaldo à teoria da totipotencialidade. Posteriormente, Reinert (1958) e Stewart *et al.*, (1958) descreveram a produção de embriões somáticos a partir de calos induzidos em floema secundário de cenoura. Reinert *et al.*, (1971) demonstrou que estes embriões originavam-se a partir de células isoladas, demonstrando a totipotencialidade das células vegetais.

Tisserat *et al.* (1979) definiu embriões somáticos como sendo aqueles que se originam a partir de células que não são o produto da fusão de gametas, e que diferenciam-se nos mesmos estádios ontogênicos observados na embriogênese zigótica (Williams & Maheswaran, 1986). São estruturas bipolares (Thorpe *et al.*, 1991) com ápice caulinar e radicular (Guerra *et al.*, 1999 a), e não possuem conexão vascular com o tecido de origem, devendo ser capazes de crescer e formar plantas normais (Villalobos & Thorpe, 1991).

Potencialmente, todos os tecidos vegetais têm capacidade para originar calos *in vitro*, contudo poucos explantes têm habilidade para produzir calos embriogênicos. Comumente se utiliza parte de plântulas como cotilédones, hipocótilos e embriões. Adicionalmente têm-se utilizado, com êxito em várias espécies, ápices caulinares, folhas, raízes e inflorescências imaturas (Ammirato, 1983). Explantes embrionários, segundo Guerra *et al.* (1999 a) possuem maior competência morfogênica, podendo suas células apresentar receptores específicos e de maior sensibilidade às substâncias hormonais (Fim, 1986) ou mesmo maior número de receptores para essas substâncias presentes no meio de cultura (Guerra *et al.*, 1999 a), resultando na formação de maior número de embriões somáticos em relação aos explantes originados de tecidos não muito jovens. Segundo

George (1993), os explantes embrionários geralmente apresentam embriogênese direta e ainda requerem menores concentrações de auxinas para sua indução.

A maioria dos sistemas embriogênicos necessitam, para a indução dos embriões, uma elevada concentração de auxina (Evans *et al.*, 1981), sendo estas consideradas mediadoras na transição das células somáticas para embriogênicas (Yeung, 1995; Dodeman *et al.*, 1997). Há várias interpretações sobre a natureza da diferenciação que resulta na embriogênese somática. Segundo Thorpe (1980), dentro de um explante certas células estão preconditionadas para os eventos morfogênicos que levam à embriogênese. Por esta razão a presença de reguladores exógenos de crescimento, comumente o 2,4-D, não só inicia o desenvolvimento dos embriões, como estimula a multiplicação clonal das células predeterminadas (Litz & Jarret, 1991). O mecanismo de ação das auxinas nos processos fisiológicos e regulatórios, está associado à presença de receptores protéicos localizados na membrana, no citoplasma e no núcleo. Quando o núcleo recebe o sinal, há ativação da RNA-polimerase II específica para a transcrição de genes envolvidos na regulação da divisão celular (Van der Linde, 1990).

A composição do meio de cultura e os fatores ambientais podem resultar na intensificação das respostas morfogênicas, bem como em maior número de explantes responsivos (Guerra & Handro, 1991). A concentração de auxinas, citocininas e giberelinas, utilizadas em combinação ou isoladamente em diferentes estágios da embriogênese – indução, multiplicação e maturação – associada ao balanço de nutrientes salinos; vitaminas, aminoácidos e fontes de nitrogênio; e luminosidade, fotoperíodo e umidade relativa, são exemplos de fatores químicos e físicos que afetam de modos distintos as diferentes espécies e explantes submetidos à micropropagação pelo processo de embriogênese somática (George, 1993).

Segundo Sharma e Thorpe (1995), a indução da embriogênese somática em angiospermas foi descrita para 280 gêneros em 94 famílias, sendo que 60% das espécies induzidas pertencem às famílias Compositae, Gramineae, Liliaceae, Orchidaceae, Rosaceae e Rutaceae.

Em contraste à embriogênese somática, a organogênese compreende o desenvolvimento de gemas ou de meristemas radiculares diretamente a partir dos explantes ou indiretamente, a partir de calos (Litz & Jarret, 1991).

Após as primeiras observações sobre a formação de raízes adventícias (White, 1939) e de raízes principais (Nobencourt, 1939) em culturas de tecidos, Skoog (1944) demonstrou o efeito estimulante das auxinas na formação de raízes e seu efeito inibidor na formação de gemas. Skoog e Tsui (1948) demonstraram que o sulfato de adenina promove o desenvolvimento de gemas, podendo-se obter um certo controle na formação de órgãos *in vitro*. O fator que promovia a divisão celular em preparações de DNA foi identificado como cinetina (Miller *et al.*, 1955). Skoog e Miller (1957) demonstraram a importância das proporções de auxina e citocinina na determinação da resposta morfogênica *in vitro*. Uma alta proporção de auxina em relação à citocinina favorece a formação de raízes, enquanto que uma baixa proporção favorece a formação de gemas.

Várias partes de uma planta podem responder diferentemente as mesmas condições de cultivo, e tais diferenças refletem o estado fisiológico do explante, que por sua vez, determinará os fatores exógenos que se deve adicionar ou remover do meio de cultura para indução da resposta morfogênica requerida (Litz & Jarret, 1991). Segundo os autores, os fatores endógenos poderão variar quantitativamente de acordo com as condições ambientais, o genótipo e o tipo de célula.

Para que a organogênese ocorra indiretamente, a partir de um calo, devem-se produzir alterações que conduzam a organização celular. Segundo Thorpe (1980), esse processo envolve diferenciação e interação celular e reação à sinais específicos. O termo organogênese de novo em cultura de tecidos refere-se a diferenciação dentro do explante, como a formação de meristemas primários a partir do floema externo de segmentos de caule de tabaco cultivado *in vitro*. As regiões de maior divisão celular formam meristemóides que fazem com que o calo tenha uma aparência nodular (Thorpe, 1980). Uma função primária da mitose na organogênese é a formação de um número crítico de células em divisão ativa que são capazes de responder aos sinais de desenvolvimento (Thorpe, 1983). Segundo o autor, os meristemóides ou regiões de células em divisão ativa, se compõem de células pequenas, isodiamétricas, com denso citoplasma, vacúolos pequenos e núcleos proeminentes, com várias organelas e grandes quantidades de amido, requerido em grande quantidade durante sua diferenciação. A maioria dos meristemóides assemelham-se aos meristemas verdadeiros e possuem conexões vasculares com o calo ou o

tecido circundante e sob condições apropriadas de cultivo podem formar gemas ou raízes primárias (Litz & Jarret, 1991).

Alguns fatores físicos como luminosidade e temperatura podem afetar a indução da organogênese *in vitro*. O efeito da luz, com fotoperíodo de 12 a 16 horas e intensidade de mil a três mil lux, pode ser atribuído ao incremento no acúmulo de amido nos tecidos cultivados, o qual é necessário para a formação de primórdios foliares. Temperaturas em torno de 25°C, bem como suas flutuações ocorridas na transição do dia para a noite, são utilizadas para a maioria das famílias cultivadas *in vitro* (Litz & Jarret, 1991).

De acordo com Aitken-Christie (1991), a consistência do meio de cultura também pode afetar os índices de produtividade em sistemas de micropropagação. Meios de cultura líquidos e semi-sólidos são muito utilizados em diferentes protocolos de cultivo *in vitro*, apresentando contudo algumas desvantagens como a imersão que leva à asfixia e hiperidricidade em explantes em culturas líquidas, e elevação do custo e tempo de subcultivo em culturas sólidas. Alvard e Teisson (1993) desenvolveram um sistema de micropropagação, conhecido como imersão temporária, que proporciona aeração aos explantes, permitindo troca de gases e fornece contato, de duração programável, entre o explante e o meio líquido, sendo que em procedimentos clássicos de culturas líquidas, esses dois fatores não são combinados. No sistema de imersão temporária, frascos contendo culturas em proliferação recebem o meio de cultura líquido de outro frasco por bombeamento em determinados intervalos de tempo. Passado o período de imersão, o meio de cultura retorna ao frasco de origem, por bombeamento e, o frasco que contém os explantes permanece “seco” até o próximo período de imersão. Este sistema pode ser utilizado para protocolos de embriogênese somática e organogênese, utilizando-se diferentes explantes como gemas e microestacas e aplicando-o á culturas como café, banana e abacaxi (Teisson & Alvard, 1995).

1.2. MICROPROPAGAÇÃO EM BROMELIÁCEAS

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* têm sido uma importante ferramenta na aquisição de conhecimentos de algumas características fisiológicas de bromeliáceas como nutrição, produção endógena de hormônios e outros aspectos do desenvolvimento dessas plantas.

Estudos *in vitro* têm demonstrado adaptações de bromélias em relação ao crescimento de planta de algumas espécies epífitas com tanque e terrestre sem tanque (Mercier & Kerbauy, 1997). As epífitas demonstram mais elevada capacidade para metabolização de fontes de nitrogênio orgânico do que as terrestres. Segundo Benzing (1970), esses resultados refletem o fato de que, sob condições naturais, o nitrogênio na forma orgânica na água pode ser a principal fonte de nitrogênio. Em contraste, o nível de nitrogênio inorgânico em epífitas é baixo.

Nos últimos dez anos, vários pesquisadores em diferentes laboratórios passaram a empregar técnicas de cultura de tecidos vegetais para a propagação massal de bromélias ornamentais. Mais recentemente, técnicas *in vitro* têm sido empregadas para propagação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (Mercier & Kerbauy, 1997).

Com relação à alguns efeitos do meio de cultura e fitoreguladores na germinação e desenvolvimento de plântulas, Mekers (1977) observou que a presença de ANA e AG₃ na concentração de 1,0 mg/l em meio de cultura Knudson (1946), promoveu a germinação de sementes de *Vriesea splendens* com uma taxa superior às testemunhas. Pierik *et al.* (1984) observando a influência de auxinas na germinação de sementes e crescimentos de algumas espécies de bromélias, constatou que a adição de ANA ao meio MS (Murashige & Skoog, 1962) estimulou o enraizamento e crescimento de brotos. O autor sugere que o lento crescimento de plântulas de bromeliáceas no solo deve-se ao baixo enraizamento como resultado de uma deficiência em auxina.

Em geral, os meios de cultura utilizados para a micropropagação de bromélias têm sido aqueles propostos por Knudson (1946) e Murashige & Skoog (1962), em estado semi-sólido ou líquido, em concentração integral ou reduzida (Mercier & Kerbauy, 1997). Aos sais de Murashige & Skoog, são adicionados, em diversas concentrações, componentes orgânicos como as vitaminas de Morel e Wetmore (1951) e sacarose como fonte de carboidrato. Ainda são adicionados fitoreguladores, em diferentes combinações, dentre os

quais o ANA e BAP são os mais freqüentemente utilizados e tidos como mais eficientes na indução de gemas axilares e adventícias, na micropropagação de bromeliáceas (Mercier & Kerbauy, 1997). Contudo, outras combinações têm sido empregadas com sucesso por diversos autores.

Zimmer e Pieper (1976) encontraram dificuldades para o estabelecimento de culturas *in vitro* de brotos e gemas axilares excisados de plantas adultas de bromélias. Hipoclorito de sódio tem sido o desinfectante mais utilizado na assepsia desses explantes, geralmente diluído em 1-20 %, em diferentes intervalos de tempo (5-30 min).

Gemas laterais foram obtidas *in vitro* a partir de secções do domo apical de plantas de abacaxi. As secções foram submetidas à tratamentos com ANA, AIB e Cinetina, na concentração de 2,0 mg/L (Fichet-Purnell *et al.*, 1993). Formação de calos e regeneração de brotos em *Ananas comosus*, foram induzidas em brotos jovens destacados da planta-mãe e cultivados *in vitro* em meio de cultura MS, suplementado com AIA, AIB e Cinetina (Bordoloi & Sarma, 1993). Os melhores resultados na formação de calos embriogênicos em folhas jovens de plântulas *in vitro* de *Ananas comosus*, foram obtidos com 2,5 e 5,0 mg/l de Dicamba e Picloram, respectivamente (Cisneros *et al.*, 1996). Quando submetidos ao meio de cultura MS líquido suplementado com ANA (2,7 µM) e BAP (4,4 µM), gemas laterais de *Ananas comosus* apresentaram taxa média de regeneração de 19,7 brotos por explante, com até três centímetros de altura (Guerra *et al.*, 1999b).

Mapes (1973), baseado em resultados obtidos em culturas de abacaxi, multiplicou *in vitro* sete espécies de bromélias ornamentais, das quais apenas três responderam positivamente ao meio Knudson modificado com leite de coco (20 %) e adenina. O meio de cultura promoveu o desenvolvimento de gemas laterais, com subsequente desenvolvimento em plântulas.

Plântulas de *Neoregelia carolinae*, foram obtidas do cultivo *in vitro* de meristemas, em meio de cultura MS, suplementado com 0,2 mg/L de ANA e 0,2mg/L de BAP (Tombolato *et al.*, 1991).

Jones e Murashige (1974) obtiveram uma média de 500 plântulas regeneradas por broto de *Aechmea fasciata*, após seis meses de cultivo *in vitro*.

Gemas de inflorescências jovens de *Dyckia distachya* foram utilizadas como explantes na indução de calos, avaliando-se diferentes concentrações de auxinas. Os calos foram induzidos com alta concentração de fitoreguladores (Daquinta *et al.*, 1998).

Culturas de plântulas obtidas através da germinação de sementes *in vitro*, são uma estratégia para o estabelecimento de culturas de bromélias. O elevado número de explantes assépticos obtidos por este método, permite que praticamente todas as partes da plântula sejam utilizadas como explantes (Mercier & Kerbauy, 1997). No caso de espécies raras ou ameaçadas de extinção, a utilização deste método é de considerável importância, haja visto a dificuldade para obter-se um grande número de plantas matrizes.

Kiss *et al.* (1995) basearam-se na indução do crescimento de brotos cultivados *in vitro* e na ausência de luz, para a obtenção de planta micropropagadas. Sais de MS e a combinação de 10,0 μM de ANA com Cinetina ou BA nas concentrações 25,0 μM e 40,0 μM , respectivamente, foram utilizados.

Bases foliares de *Cryptanthus sinuosos*, obtidas através do cultivo de estolões *in vitro* em meio de cultura MS, foram submetidas à diferentes concentrações de BAP ou TDZ. Culturas de explantes foliares na presença de BAP (22 μM) resultaram em altas taxas de proliferação de brotos, em torno de 60, mantendo sua capacidade de multiplicação por dois anos, em subcultivos. O número de brotos induzidos por TDZ foi significativamente inferior (cerca de 20 brotos) aos explantes induzidos por BAP (Carneiro *et al.*, 1998 a).

Os primeiros trabalhos com a micropropagação de bromélias feitos no LFDGV revelaram que em *Nidularium innocentii*, a taxa média de proliferação de brotos (23,0) foi obtida em meio de cultura MS suplementado com 2,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP. Para *Vriesea carinata* e *Wittrockia superba*, nesse tratamento a taxa média de multiplicação foi, 15,4 e 21,8, respectivamente (Alves & Guerra, 1995). *N. innocentii* apresentou, na quinta repicagem, taxa média de proliferação de 26,8 gemas. *Aechmea fosteriana* apresentou a maior taxa média de proliferação de 11,2 gemas, na segunda repicagem, quando submetida ao tratamento (ANA 2 μM ; BAP 6 μM). Para *Canistrum lindenii* a maior taxa média de proliferação de brotos (15,1) deu-se na segunda repicagem com o tratamento (ANA 2 μM ; BAP 4 μM) (Alves & Guerra, 1996). *Aechmea blumenavii*, *A. fasciata*, *A. gamosepala*, *A. kleinii*, *Bilbergia* sp, *Hohenbergia augusta*, *Neoregelia carolina*, *Vriesea brusquensis*,

Vriesea friburgensis var. *paludosa* são algumas das espécies propagadas *in vitro*, atualmente, no LFDGV.

Bases foliares de *Vriesea reitzii*, provenientes de planta cultivadas *in vitro*, foram submetidas à diferentes concentrações de 2,4-D e KIN, constatando-se, aos 30 dias da inoculação, a presença de massas celulares surgidas na região periférica dos explantes (Alves & Guerra, 1996). O padrão de resposta morfogênica observado nesta espécie aparentemente indica um padrão regenerativo associado à embriogênese somática.

1.3. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Além de sua importância ecológica, coabitando com outras espécies da flora e fauna, as bromeliáceas possuem inesgotável valor ornamental, sendo ameaçadas não só pela devastação das matas, mas também pelo extrativismo que leva a comercialização ilegal dessas plantas. Deste modo, juntamente com as pesquisas para propagação massal dessas espécies, faz-se necessário inseri-las num contexto de conservação de germoplasma e manejo *in situ*, partindo de sua caracterização genética.

O conceito de conservação implica na manutenção da variabilidade genética das espécies, bem como da perspectiva evolutiva ou dinâmica de suas populações. Desta forma, a conservação pode se referir à manutenção de toda biodiversidade, ou seja, o conjunto de organismos de um dado ecossistema, sua variação, suas interações e as variações ambientais existentes (Heywood & Baste, 1995; Reis, 1996).

De acordo com Reis (1996) o manejo, ou a utilização racional de populações naturais pode ser entendido como a exploração controlada das populações de uma dada espécie, visando a obtenção de um produto direto, como madeira, palmito, frutos e flores, ou indireto, como metabólitos secundários. O manejo, no entanto, só será sustentável, se a cada ciclo de exploração houver regeneração natural da população através do desenvolvimento dos indivíduos remanescentes e da reposição de propágulos para manutenção do banco de planta, sendo imprescindível a permanência de indivíduos em fase reprodutiva, nas áreas utilizadas, a fim de garantir a ressemeadura natural. E, para que os níveis de rendimento se mantenham, é necessário a manutenção da variabilidade genética

dos indivíduos remanescentes, garantindo a continuidade do processo microevolutivo, como resultado das recombinações gênicas nas gerações subseqüentes.

O estudo da organização genética de populações naturais de espécies tropicais vem sendo relacionado ao reconhecimento da importância da diversidade e variabilidade genética dentro das espécies vegetais para o futuro da humanidade, trazendo subsídios para o estabelecimento de estratégias de conservação e de utilização racional das populações naturais de plantas (Reis, 1996).

A reprodução é o processo que transfere a formação genotípica atual para as próximas gerações, enquanto que a dispersão do pólen e sementes determina o padrão pós-reprodutivo da dispersão de genes dentro e entre as populações (Loveless & Hamrick, 1984). Deste modo, as populações vegetais são estruturadas geneticamente no tempo e no espaço (Allard, 1975). Esta estrutura pode se manifestar entre populações distintas geograficamente, dentro de um grupo local de plantas ou em indivíduos de uma progênie. Tal estruturação decorre de fatores tais como mutação, migração, seleção e deriva genética, os quais operam conjuntamente, dentro do contexto histórico e biológico de cada espécie, resultando na estrutura genética (Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick & Loveless, 1986).

Fatores ecológicos, sistemas de reprodução e dispersão de propágulos são particularmente importantes na determinação da estrutura genética das espécies. Assim, plantas autógamas apresentam dentro da população, reduzida heterozigosidade, enquanto que em plantas alógamas apresentam alta heterozigosidade. A dispersão de sementes por gravidade leva a um aumento nos valores da homozigose dentro da população, enquanto que as sementes dispersas pelo vento, possibilitam variação genética dentro da população (Loveless & Hamrick, 1984).

Neste contexto, a utilização de marcadores alozímicos na investigação da variabilidade genética, dentro e entre populações, têm contribuído para pesquisas em ecologia, evolução, genética de populações, sistemas de reprodução e conservação de recursos genéticos (Hamrick & Godt, 1989).

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

2.1. GERAL

No presente trabalho avaliou-se a indução e expressão de rotas morfogênicas *in vitro* das espécies *Vriesea reitzii* e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, testando-se diferentes combinações e concentrações de fitoreguladores em distintos sistemas de micropropagação, especificados em cada experimento, bem como a caracterização genética de uma população natural de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, visando a propagação massal e a conservação de germoplasma.

Estudos desta ordem podem auxiliar em muito o desenvolvimento de protocolos adequados de micropropagação para diversas espécies desta família, constituindo assim uma ferramenta de grande valia para reproduzir em espaços mais curtos de tempo e em maior volume muitas espécies que estão em risco de extinção, possibilitando também a criação de um banco de germoplasma das espécies características do nosso Estado.

A escolha das espécies citadas decorre da representatividade e abundância deste gênero no Estado de SC, do endemismo acentuado de parte destas espécies e dos riscos de erosão genética causados principalmente pela alteração e perda dos habitats no qual elas encontram-se inseridas. Sob o aspecto da cultura de tecidos vegetais, a principal justificativa para seu estudo relaciona-se com o fenômeno incidentalmente observado, em estudos preliminares, na germinação *in vitro* de sementes de várias espécies deste gênero e até então não relatado na literatura específica. Nestas condições, observou-se, em meios de cultura isentos de fitoreguladores, a profusão, a partir destas sementes, de complexos celulares com características meristemáticas, os quais, sob condições adequadas, evoluem e organizam-se em estruturas similares a meristemóides, denominados de microgemmas no presente trabalho.

2.2. ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito de diferentes concentrações 2,4-D e KIN sobre a indução morfogênica em bases foliares de *Vriesea reitzii*;
- b) Comparar a eficiência do sistema de imersão temporária em relação ao sistema convencional na micropropagação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, e o efeito de diferentes combinações e concentrações de ANA, BAP e PBZ, sobre a multiplicação de brotos axilares, a partir de planta obtidas *in vitro*;
- c) Avaliar o efeito de ANA, AG₃, BAP, KIN, 2,4-D e 2IP e do meio de cultura basal isento de fitoreguladores, sobre a multiplicação de brotos, e o efeito de diferentes concentrações de AG₃ sobre o crescimento de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, determinando sua rota de micropropagação;
- d) Investigar a origem e evolução das estruturas morfogênicas denominadas microgemas.
- e) Caracterizar geneticamente, por marcadores alozímicos, uma população natural de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, estimando frequências alélicas e índices de diversidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os meios de cultura utilizados nos experimentos a seguir foram constituídos pelos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementados com sacarose (3,0 % p/v) e 2 ml.l⁻¹ de vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), e solidificados ou não, com ágar (0,7 % p/v), sendo o pH 5,8 ajustado antes da autoclavagem à 121°C, durante 15 minutos. No presente trabalho, estes meios de cultura serão referenciados como meio de cultura basal.

As culturas foram manipuladas sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (CFL), e seu desenvolvimento deu-se em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 1°C, umidade relativa (UR) de 60 ± 5 %, 37μE/ m²/s e fotoperíodo de 16 horas, ou na ausência de luz quando necessário.

Para análises estruturais, amostras representativas dos tratamentos selecionados foram fixadas em FAA – 50 (Sass, 1951) e desidratadas em série ascendente etílica e em xilol, e incluídas em parafina. Secções seriadas de 8-12 μm de espessura foram obtidas em micrótomo, posteriormente distendidas e coradas com safranina e fast-green. Registraram-se por fotomicrografia os aspectos estruturais relevantes.

Os registros fotográficos foram feitos em câmara Olympus PM-20, utilizando-se o estereomicroscópio SZH10 e os microscópios BX-40 (B-max) e invertido IMT-2.

Os resultados em número de gemas, percentagem de explantes induzidos e peso, foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de separação de médias (SNK 5 %) e, quando necessário, por análise não paramétrica de Kruskal - Wallis, segundo as recomendações de Sokal e Rohlf (1995), com auxílio do software Statgraphics. Anteriormente às análises, os dados foram submetidos ao teste F-máximo para verificação da heterogeneidade das variâncias (S²) e transformação dos dados, especificada em cada experimento, a seguir. As análises de variância e coeficientes de variação, de cada experimento, estão demonstrados no Anexo I, e os dados originais, no Anexo II.

4. Formação de massas celulares embriogênicas em bases foliares de *Vriesea reitzii*.

Bases foliares de monocotiledôneas apresentam vascularização e podem conter células competentes para a rediferenciação celular, quando ativadas por sinais químicos como os fitoreguladores (Hosoki & Asahira, 1980). Tratamentos compostos por ANA e BAP aplicados à bases foliares de diversas espécies de bromeliáceas (Hosoki & Asahira, 1980; Mercier & Kerbauy, 1997; Carneiro *et al.*, 1998 b) promoveram a regeneração de gemas, através do processo organogênico. O presente ensaio visou a indução da gênese celular em bases foliares de *Vriesea reitzii*, buscando um modelo de rediferenciação com características embriogênicas.

No presente ensaio avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e KIN sobre a morfogênese *in vitro* em bases foliares de *Vriesea reitzii*.

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Vriesea reitzii* foram submetidas a um processo de desinfestação, ficando submersas por três minutos em etanol 70 % e, posteriormente, em hipoclorito de sódio 2 %, durante 35 minutos. Passado este período, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e esterilizada, sendo então inoculadas em frascos contendo 20 ml de meio de cultura basal.

Para a multiplicação de brotos axilares, plântulas com 1,5 cm de altura, obtidas 60 dias após a germinação *in vitro* das sementes, foram segmentadas para a retirada do sistema radicular e posteriormente inoculadas em frascos de vidro (65 x 125 mm), cobertos com tampas plásticas e vedados com filme de pvc, contendo 15 ml de meio de cultura MS líquido suplementado com ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M). As plântulas foram mantidas nesse tratamento por 60 dias, onde formaram-se rosetas com diversos novos brotos, que foram empregados neste experimento. A região basal das folhas desses brotos foram isoladas e submetidas à novos tratamentos. Os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo 25 ml de meio de cultura basal semi-sólido adicionado de diferentes fitoreguladores em combinação, compondo os seguintes tratamentos: meio de cultura basal isento de fitoreguladores - testemunha; 2,4-D (5,0 μ M) e KIN (1,0 μ M); 2,4-D (10,0 μ M) e

KIN (1,0 μM); e 2,4-D (20,0 μM) e KIN (1,0 μM). A incubação das culturas deu-se na ausência de luz.

Os tratamentos foram compostos por oito repetições, sendo que cada repetição equivale à uma placa de Petri contendo oito explantes em 25 ml de meio de cultura. Foi avaliada a porcentagem de explantes com proliferação celular em cada repetição, 45 dias após a inoculação. Os dados foram transformados em $\log(x+2)$ e o experimento foi avaliado por Análise de Variância, e Teste de Separação de Médias (SNK 5,0 %).

Para a regeneração de gemas, as estruturas globulares obtidas após 30 dias de cultivo sob o tratamento 2,4-D (20,0 μM) e KIN (1,0 μM), foram isoladas e cultivadas, sob luminosidade, em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura basal semi-sólido suplementado com diferentes fitoreguladores em combinação, compondo os seguintes tratamentos: meio de cultura basal isento de fitoreguladores - testemunha; BAP (2,5 μM) e ANA (0,5 μM); KIN (2,5 μM) e ANA (0,5 μM); e 2IP (2,5 μM) e ANA (0,5 μM).

Para a regeneração de gemas, foram utilizadas dez repetições, com um explante cada, por tratamento, inoculados em tubos de ensaio com 15 ml de meio de cultura. Para a avaliação da ocorrência de gemas e raízes nos explantes, 30 dias após a inoculação, utilizou-se o teste X^2 .

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 45 dias após a inoculação de bases foliares de *Vriesea reitzii*, constatou-se a presença de massas celulares surgidas na região periférica dos explantes (Figura 1). Os dados apresentados na Tabela 1 demonstram que o tratamento composto por 2,4-D (20,0 μM) e KIN (1,0 μM) promoveu o maior percentual de explantes com formação de calos embriogênicos (90,62%), não diferindo estatisticamente do tratamento composto por 2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM) (67,18%) e diferindo dos demais tratamentos. O tratamento composto por 2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM) não diferiu do tratamento composto por 2,4-D (10,0 μM) e KIN (1,0 μM) (45,31%), e ambos diferiram do tratamento testemunha (6,25%). Cisneros *et al.* (1996) demonstraram a obtenção de calos embriogênicos em explantes foliares de plantas micropropagadas de abacaxi somente com a utilização de Dicamba e Picloram, em concentrações de 2,5 à 5,0 mg/l.

As formações celulares induzidas neste trabalho, apresentaram-se com as mesmas características em todos os tratamentos empregados: formas globulares, de coloração amarela e intensa, surgidas nas regiões periféricas da base foliar (Figura 1a). As estruturas globulares apresentaram-se bastante friáveis, individualizando-se com facilidade e originando novas e semelhantes estruturas, caracterizando processos morfogênicos repetitivos (Figura 1c). A Figura 1b permite visualizar os setores do explante foliar em que surgem as estruturas globulares, sobrepostas ao tecido parenquimático. Na Figura 1d, pode-se observar a presença, nessas estruturas, de regiões meristemáticas e feixes vasculares. A redução gradual da coloração sinalizou o início da degeneração das estruturas globulares, culminando em necroses irreversíveis, não havendo regeneração de células sobre ou de forma adjacente às estruturas necrosadas.

Estruturas semelhantes às obtidas em bases foliares de *Vriesea reitzii*, foram encontradas em microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (Figura 3g e Figura 4a). No entanto, em bases foliares e em segmentos nodais de plântulas micropropagadas de *Neoregelia* sp e *Bilbergia* sp, submetidas aos mesmos tratamentos (2,4-D e KIN), em situação não experimental, apresentaram massas celulares translúcidas e compactas, sem estruturas globulares e mantendo-se com as mesmas características, sem haver degeneração ou crescimento, na presença ou ausência de luminosidade, por aproximadamente 12 meses. Sugere-se então, que estas estruturas globulares possam ser características do gênero *Vriesea*.

As respostas morfogênicas observadas neste trabalho revelam a indução de um modelo com características embriogênicas, o que é pouco comum para as bromélias. Nestas, o padrão preferencial de respostas é a organogênese, que manifesta-se através da proliferação de brotos, sem a presença de calos intermediários (Carneiro *et al.*, 1998 b). Explantes foliares removidos de plântulas de *Vriesea fosteriana* e *Dyckia macedoi* (Mercier & Kerbauy, 1992, 1993) produziram, em sua região basal, gemas adventícias. Em *D. macedoi*, gemas foram formadas diretamente do tecido foliar e de protuberâncias, após dois meses de cultura, enquanto em *Vriesea fosteriana* 15 gemas formaram-se somente através de protuberâncias depois de um mês de cultivo em meio semi-sólido Knudson (1946) suplementado com ANA (2,7 μ M) e BAP (8,9 μ M) (Mercier & Kerbauy, 1997). Resultados apresentados por Hosoki e Asahira (1980) demonstraram a formação de

protuberâncias na parte basal de tecidos foliares de *Aechmea fasciata*, *Quesnelia quesneliana* e *Vriesea poelmannii*. Passados 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com ANA (1,0 mg/l) e BAP (1,0 mg/l), desenvolveram-se gemas (aproximadamente 10 por explante, em cada espécie) a partir das protuberâncias. O alto potencial regenerativo de explantes foliares é atribuído, por esses autores, à presença de meristemas axilares intercalados encontrados na região basal. Em *Neoregelia cruenta* brotos diferenciaram-se diretamente de protuberâncias em bases foliares, em meio MS semi-sólido suplementado com ANA (2,5 μ M) e BAP (22,0 μ M), quatro semanas após o início do cultivo (Carneiro *et al.*, 1998 b).

No presente trabalho, passados 45 dias da indução de massas celulares em bases foliares de *Vriesea reitzii*, as estruturas globulares induzidas pelo tratamento composto por 2,4-D (20,0 μ M) e KIN (1,0 μ M) (maior percentagem de explantes com massa celular), submetidas a novos tratamentos para regeneração de gemas apresentaram os seguintes resultados, 30 dias após a inoculação: o tratamento testemunha e o tratamento composto por BAP (2,5 μ M) e ANA (0,5 μ M) propiciaram a regeneração de gemas e, secundariamente a formação de pilosidades; quando submetidas ao tratamento composto por KIN (2,5 μ M) e ANA (0,5 μ M), houve a regeneração de gemas em seis repetições, sendo que cinco dessas repetições apresentaram pilosidade; os explantes submetidos ao tratamento composto por 2IP (2,5 μ M) e ANA (0,5 μ M) apresentaram maior regeneração de gemas (oito repetições) e também maior ocorrência de pilosidade, em seis dessas repetições. Na Tabela 2 pode-se observar o número de explantes com e sem regeneração de gemas e com e sem formação de pilosidade, os valores esperados para os números obtidos, e o número de explantes inviabilizados por necrose em cada tratamento. De acordo com a distribuição qui-quadrada, os valores observados se ajustam aos valores esperados em 93,0 % (teste qui-quadrado: 0,42; com 3 graus de liberdade) para a regeneração de gemas, e em 83,0 % (teste qui-quadrado: 0,87; com 3 graus de liberdade) para a formação de pilosidades.

Aparentemente as formações pilosas (Figura 1g) são numerosas raízes visíveis com auxílio de estereomicroscópio. Essas raízes não encontravam-se associadas às gemas regeneradas, sendo formadas diretamente das estruturas globulares. A regeneração de gemas teve início aos 20 dias (Figuras 1e e 1f) da inoculação simultaneamente em todos os

tratamentos. Dez dias após a regeneração, houve necrose (Figura 1h) dos explantes tornando-os inviáveis.

Tabela 1. Percentagem média de bases foliares de *Vriesea reitzii* cultivadas *in vitro*, com formação de calos, em resposta à diferentes concentrações de 2,4-D e KIN (1,0 μ Mol), em meio de cultura semi-sólido MS (Murashige & Skoog, 1962), 60 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, $P < 0,05$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

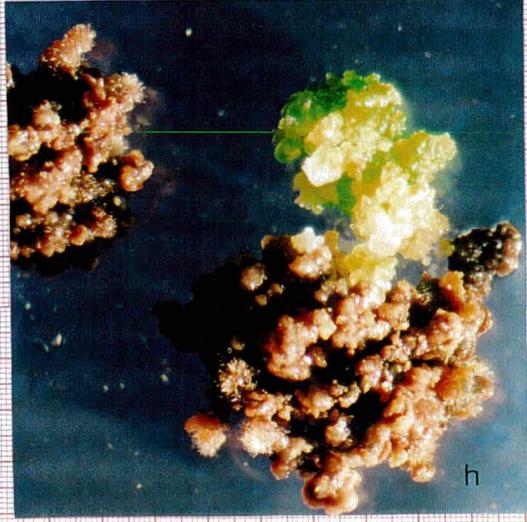
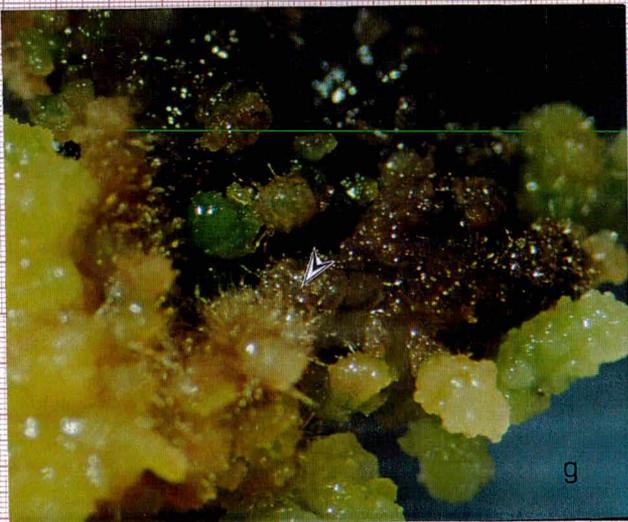
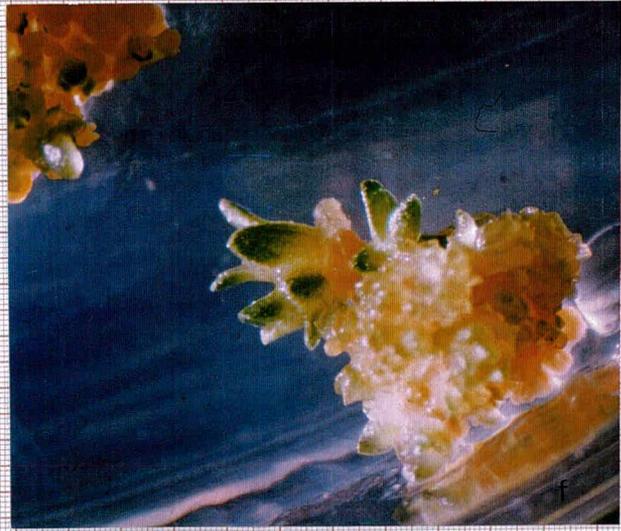
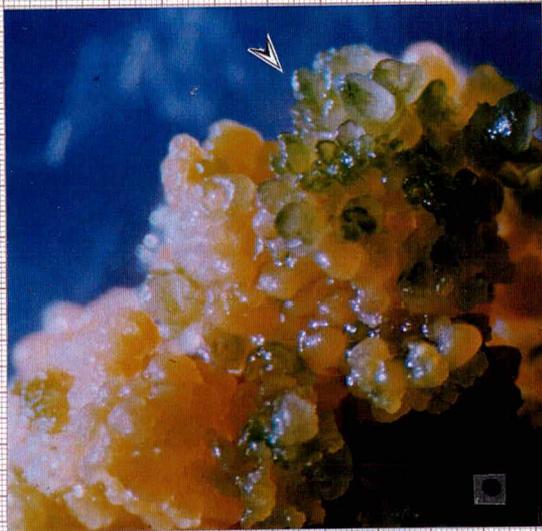
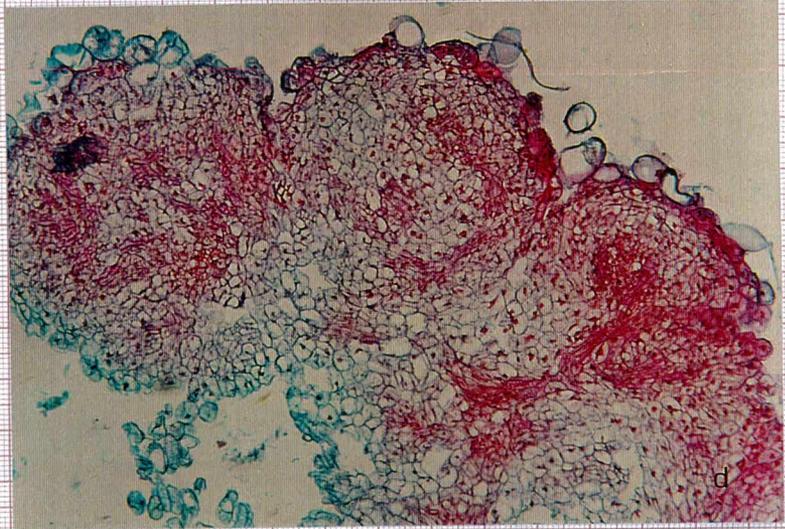
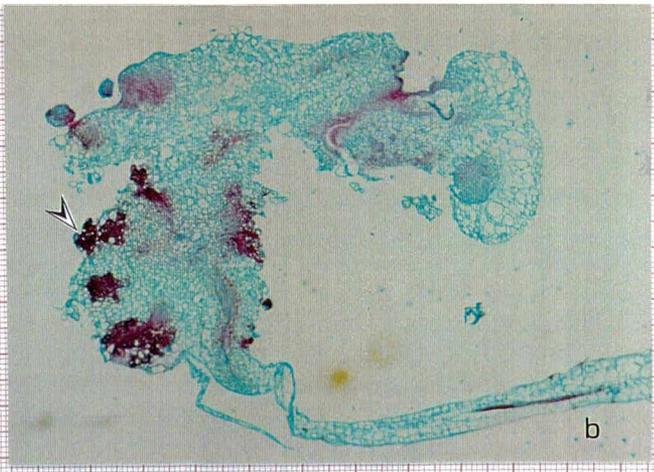
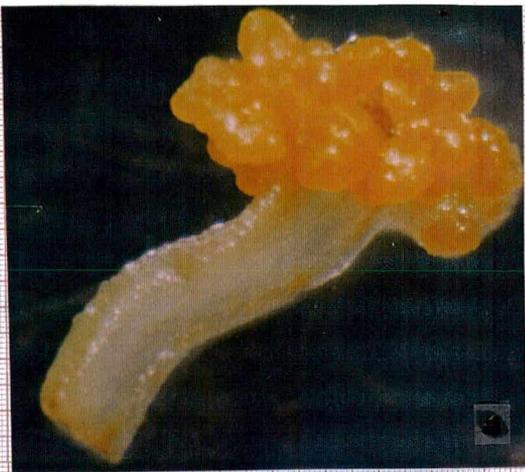
Tratamentos		Indução de calos (%)
2,4-D (μ M)	KIN (μ M)	
20,0	1,0	90,62 A
10,0	1,0	67,18 AB
5,0	1,0	45,31 B
0,0	0,0	6,25 C
CV (%) - 14,04		

Tabela 2. Número de explantes com e sem regeneração de gemas e raízes, valores esperados para esses números e número de explantes necrosados, submetidos à diferentes fitoreguladores, BAP, KIN e 2IP (2,5 μ M), associados ao ANA (0,5 μ M), em meio de cultura semi-sólido MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Tratamentos	Testemunha	BAP (2,5 μ M) e ANA (0,5 μ M)	KIN (2,5 μ M) e ANA (0,5 μ M)	2IP (2,5 μ M) e ANA (0,5 μ M)
Explantes c/ gemas	6 (7,14)*	7 (5,55)	6 (6,35)	8 (7,94)
Explantes s/ gemas	3 (1,85)	0 (1,44)	2 (1,64)	2 (2,05)
Explantes c/ raízes	4 (5,02)	4 (3,91)	5 (4,47)	6 (5,58)
Explantes s/ raízes	5 (3,97)	3 (3,09)	3 (3,52)	4 (4,41)
Explantes necrosados	1	3	2	0

*- Valor esperado

Figura 1. a) Estruturas globulares induzidas em bases foliares de *Vriesea reitzii*, aos 20 dias de cultivo em meio de cultura basal suplementado com 2,4-D (20,0 μM) e KIN (1,0 μM) (10 x). b) Corte longitudinal da base foliar demonstrando os setores meristemáticos onde desenvolvem-se as estruturas globulares (lupa, 50 x). c) Estruturas globulares em individualização e multiplicação no mesmo meio de cultura utilizado para indução, suplementado com 2,4-D (20,0 μM) e KIN (1,0 μM) (7,5 x). d) Corte longitudinal demonstrando estruturas globulares (estereomicroscópio, 20 x). e) Estruturas globulares aos 20 dias de cultivo sob luminosidade e em meio de cultura basal suplementado com 2IP (2,5 μM) e ANA (0,5 μM), apresentando atividade fotossintética e regeneração de gemas (15 x). f) Broto regenerado, aos 40 dias de cultivo em meio de cultura basal suplementado com 2IP (2,5 μM) e ANA (0,5 μM) (10 x). g) Estruturas globulares apresentando formações radiculares, quando submetida ao meio de cultura basal suplementado com 2IP (2,5 μM) e ANA (0,5 μM), aos 30 dias de cultivo (15 x). h) Estruturas globulares degeneradas, submetidas ao meio de cultura basal suplementado com BAP (2,5 μM) e ANA (0,5 μM), aos 45 dias de cultivo (10 x). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.



5. Multiplicação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, via organogênese direta, em sistema convencional e em sistema de imersão temporária de propagação *in vitro*.

O emprego do meio de cultura líquido é descrito como um caminho para a redução dos custos da produção de plantas *in vitro*. A maior vantagem seria a redução nos intervalos de subcultivo, considerando que os nutrientes estão mais facilmente disponíveis aos explantes. Culturas em meio líquido apresentam, no entanto, sintomas de asfixia e hiperhidricidade como resultado da imersão e das condições atmosféricas em que se encontram (Aitken-Christie, 1991).

No sistema de imersão temporária, desenvolvido por Teisson e Alvard (1995), demonstrado na Figura 2, frascos contendo culturas em proliferação recebem o meio de cultura líquido de outro frasco por bombeamento em determinados intervalos de tempo. Passado o período de imersão, o meio de cultura retorna ao frasco de origem, por bombeamento e, o frasco que contém os explantes permanece “seco” até o próximo período de imersão. O processo de enchimento e esvaziamento do frasco contendo culturas em propagação, com meio líquido, deve permitir trocas gasosas, e evitar o contato permanente das plântulas com o meio de cultura, minimizando os sinais de hiperhidricidade e elevando as taxas de proliferação.

Dois experimentos foram delineados, para comparar a eficiência dos sistemas de micropropagação, convencional e imersão temporária, na multiplicação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

No presente ensaio: a) avaliou-se o efeito de diferentes combinações e concentrações de ANA, BAP e PBZ, sobre a multiplicação de brotos axilares, a partir de plantas obtidas *in vitro*; b) comparou-se a eficiência do sistema convencional em relação ao sistema de imersão temporária na micropropagação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

5.1. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* foram submetidas a um processo de desinfestação, ficando submersas por três minutos em etanol 70 % e, posteriormente, em hipoclorito de sódio 2 %, durante 35 minutos. Passado este período, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e esterilizada, sendo então inoculadas em frascos contendo 20 ml de meio de cultura basal.

Para a multiplicação de brotos axilares, plântulas com 1,5 cm de altura, obtidas 60 dias após a germinação *in vitro* das sementes, foram segmentadas para a retirada do sistema radicular e posteriormente inoculadas em frascos de vidro (65 x 125 mm), cobertos com tampas plásticas e vedados com filme de pvc, contendo 15 ml de meio de cultura MS líquido suplementado com ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M). As plântulas foram mantidas nesse tratamento por dois subcultivos de 45 dias, onde formaram-se rosetas com diversos novos brotos, que foram utilizados para os experimentos de micropropagação em sistema convencional e de imersão temporária. Para o experimento utilizando o sistema convencional de micropropagação, brotos isolados destas rosetas foram inoculadas em frascos contendo 15 ml de meio de cultura basal líquido adicionado de diferentes fitoreguladores em combinação ou isoladamente compondo os seguintes tratamentos: meio de cultura basal isento de fitoregulador - testemunha; ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M); ANA (2,0 μ M), BAP (4,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M). Aos 60 dias após a inoculação, as culturas foram transferidas para meio de cultura basal líquido contendo AG₃ (3,0 μ M) de giberelina para crescimento dos brotos, mantendo-os neste meio por mais 30 dias.

No experimento em que utilizou-se o sistema de imersão temporária como método de propagação *in vitro*, cinco aglomerados com três brotos foram inoculados em um erlenmeyer (2,0 litros) que recebeu, durante três minutos (tempo de imersão) em intervalos de três horas, 500 ml de meio de cultura basal líquido adicionado de diferentes fitoreguladores em combinação ou isoladamente compondo os seguintes tratamentos: meio de cultura basal isento de fitoregulador - testemunha; ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M); ANA (2,0 μ M), BAP (4,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M). Passados 60 dias da inoculação, os tratamentos foram substituídos por meio de cultura basal líquido adicionado

de AG_3 ($3,0 \mu M$) para crescimento dos brotos, mantendo-se as brotações neste meio por 30 dias.

Para o sistema convencional os tratamentos foram compostos por dez repetições, sendo que cada repetição equivaleu à um frasco contendo três brotos em 15 ml de meio de cultura. Foram avaliados o número de brotações por plântula (considerando-se a média das brotações obtidas em três brotos por repetição), diâmetro e altura em mm, considerando-se a média de cinco brotos por repetição, 90 dias após a inoculação. O experimento foi avaliado por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK 5,0 %). Os dados foram transformados em $\log(x+2)$.

No sistema de imersão temporária os tratamentos foram compostos por quatro blocos com uma repetição, sendo que cada repetição equivale à um erlenmeyer contendo cinco aglomerados de três brotos, em 500,0 ml de meio de cultura. Foram avaliados: número de aglomerados totais por repetição e taxa de proliferação de brotos por aglomerados iniciais, 90 dias após a inoculação. Os dados de número de aglomerados foram transformados em $\log(x+2)$ e avaliados por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK-5 %). A taxa de proliferação de brotos foi avaliada por estatística de Kruskal – Wallis, seguindo as recomendação de Sokal e Rohlf (1995).

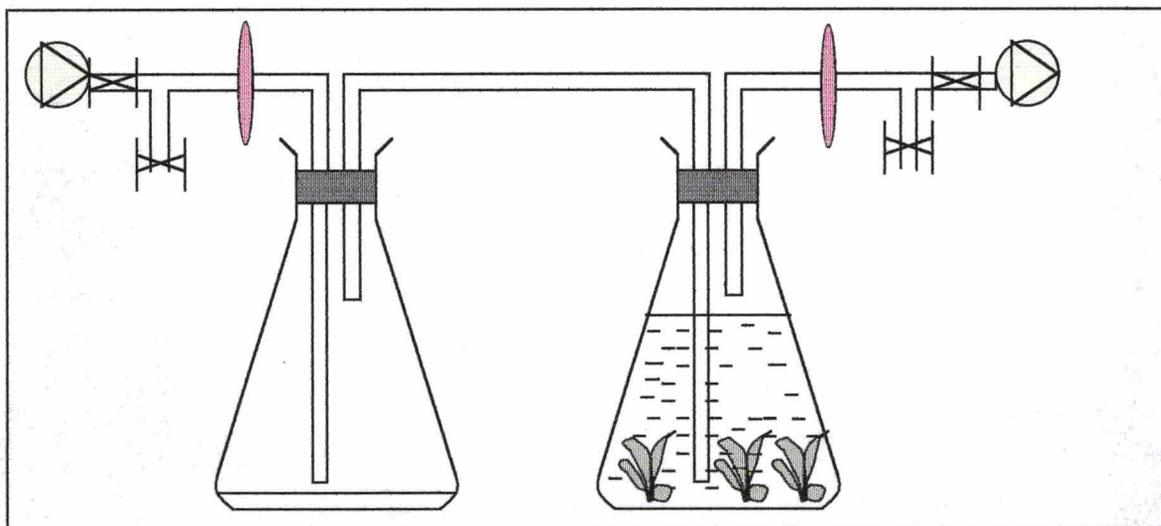


Figura 2. Unidade Experimental do sistema de imersão temporária. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sistema convencional, aos 90 dias da inoculação, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as médias de proliferação de brotos por explante em *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* promovidas pelos distintos tratamentos (Tab. 3). Os dados observados revelam que o tratamento PBZ (3,0 μ M) promoveu a maior taxa média de proliferação (26,16 brotos) não diferindo do tratamento composto por ANA (2,0 μ M), BAP (4,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M), que promoveu taxa média de proliferação de brotos de 20,10. Ambos mostraram-se mais eficientes que o tratamento composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M) (11,13 brotos), utilizado até então como o tratamento mais adequado para a proliferação de brotos em uma série de protocolos regenerativos, como na micropropagação de abacaxizeiro (Guerra *et al.*, 1999 b). Quando submetidos ao tratamento isento de fitoreguladores, a taxa média de proliferação de brotos foi de 6,13.

Com menor taxa de proliferação de brotos, o tratamento isento de fitoreguladores e o tratamento composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M) promoveram o desenvolvimento de brotos com maior diâmetro, em relação ao tratamento composto por ANA (2,0 μ M), BAP (4,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M) e o tratamento PBZ (3,0 μ M), 2,36 e 2,12 mm, respectivamente. O tratamento isento de fitoreguladores não diferiu estatisticamente do tratamento composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M) e diferiu dos demais tratamentos. O tratamento composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M) não diferiu do tratamento composto por ANA (2,0 μ M), BAP (4,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M) e diferiu do tratamento PBZ (3,0 μ M).

O tratamento isento de fitoreguladores promoveu o desenvolvimento de brotos com maior altura (24,26 mm) não diferindo do tratamento composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), estatisticamente. O tratamento composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M) e o tratamento composto por ANA (2,0 μ M), BAP (4,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M) não diferiram estatisticamente entre si e diferiram do tratamento PBZ (3,0 μ M), como indicam os dados da Tabela 3. Os tratamentos que propiciaram maiores taxas de proliferação de brotos, promoveram o desenvolvimento de brotos com diâmetro e altura menores, quando comparadas à brotos submetidas aos tratamentos que propiciaram menores taxas de proliferação de brotos.

No sistema de imersão temporária as repetições de cada tratamento possuíam, inicialmente cinco aglomerados de três brotos. Aos 90 dias após a inoculação, somente o tratamento PBZ (3,0 μ M) diferiu estatisticamente dos demais tratamentos para o número de aglomerados totais, sendo que o número inicial de aglomerados em PBZ (3,0 μ M) reduziu para 4,0. O tratamento composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M) promoveu o desenvolvimento de 17,0 aglomerados e o tratamento isento de fitoreguladores propiciou um aumento no número inicial de aglomerados para 9,75. O tratamento composto por ANA (2,0 μ M), BAP (4,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M) promoveu o desenvolvimento de 6,75 aglomerados, como indicam os dados da Tabela 4.

Quando submetidos ao tratamento composto por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), os aglomerados tiveram maior taxa de proliferação (50,00 gemas) não diferindo estatisticamente do tratamento composto por ANA (2,0 μ M), BAP (4,0 μ M) e PBZ (3,0 μ M) e do tratamento isento de fitoreguladores, que promoveram taxas de proliferação de brotos de 34,20 e 25,50, respectivamente. Com taxa de proliferação de 7,25 gemas por aglomerado, o tratamento PBZ (3,0 μ M) diferiu dos demais tratamentos. Na Tabela 4, pode-se verificar as taxas de proliferação de brotos por aglomerado.

O tratamento isento de fitoreguladores promoveu o maior desenvolvimento de brotos em relação aos demais tratamentos. A utilização de AG₃ (3 μ M) para crescimento dos brotos não foi eficiente. Passado o período de 30 dias, os brotos submetidos aos experimentos de micropropagação em sistema convencional e de imersão temporária, não apresentaram tamanho suficiente para aclimatização e foram transferidos para frascos comuns com meio de cultura basal líquido, para manutenção do germoplasma.

5.2.1. Eficiência do sistema de imersão temporária em relação ao sistema convencional na micropropagação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*

Comparativamente às plantas desenvolvidas *in vivo*, as plantas micropropagadas, em geral, apresentam-se pouco lignificadas, com células de paredes pouco espessadas, com abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, e reduzida quantidade de tecidos de sustentação – colênquima e esclerênquima (Donnelly *et al.*, 1985), estando sujeitos à desordens morfológicas e fisiológicas como a hiperidricidade. Plantas hiperídricas, conhecidas como vitrificadas, caracterizam-se pela formação de caules curtos, delgados e translúcidos, com entrenós reduzidos, e de folhas com parênquima lacunoso hipertrofiado. As células dos tecidos hiperídricos sofrem alterações como a redução do citoplasma acompanhada do aumento do volume de água, em decorrência do enfraquecimento das paredes celulares (Kevers *et al.*, 1988). A baixa taxa fotossintética, determinada pela redução do tecido paliçádico e da quantidade de clorofila, constitui um dos principais fatores responsáveis pelo aspecto translúcido das plantas hiperídricas (Ziv, 1991). Folhas de plantas *in vitro* também possuem menor quantidade de cera epicuticular do que as folhas de plantas desenvolvidas *in vivo* (Baker, 1974) e conseqüentemente, ocorre transpiração excessiva que, aliada à redução no número de estômatos, ao mal funcionamento do mecanismo de abertura e fechamento estomático e à má estruturação do clorênquima, levam ao dessecamento e murchamento das folhas (Campostrini & Otoni, 1996).

Essas desordens fisiológicas são ocasionadas pela utilização de recipientes fechados que restringem a troca de gases. Por limitações impostas pela composição da atmosfera dos frascos, o crescimento e desenvolvimento das plantas em cultura pode não se expressar plenamente. A redução do crescimento das plantas sob esse sistema de cultivo tem sido explicada pela baixa capacidade fotossintética, em função de uma rápida queda na concentração de CO₂ no recipiente e pela alta umidade relativa (Ziv, 1995; Campostrini & Otoni, 1996).

A utilização de retardantes de crescimento e frascos que mantenham baixa a umidade relativa e permitam trocas gasosas, é recomendada para a redução do murchamento, no processo de aclimatização, como ocorreu em brotos de rosa e crisântemo (Roberts *et al.*, 1992). O sistema de imersão temporária proporciona aeração aos explantes,

permitindo troca de gases e fornece contato, de duração programável, entre o explante e o meio líquido. Em procedimentos clássicos de culturas líquidas, esses dois fatores não são combinados (Alvard & Teisson, 1993).

O paclobutrazol [(2RS,3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol] é um retardante de crescimento. Estudos sobre seus efeitos demonstram que a redução no murchamento de brotos está associada ao incremento na deposição de cera epicuticular por unidade de área foliar, melhora no mecanismo de abertura e fechamento estomatal, e redução na taxa peso fresco/peso seco (Smith *et al.*, 1990; Roberts & Mathews, 1995). Como outros retardantes de crescimento, o paclobutrazol induz um encurtamento dos internós de plantas superiores, redução no tamanho de folhas, intensificação da coloração verde nas mesmas e espessamento de raízes (Graebe, 1987). O paclobutrazol age, dentre outras formas, inibindo a ação de giberelinas, quebrando a dominância apical e facilitando a atuação de citocininas endógenas ou sintéticas, promovendo um aumento substancial nas taxas de proliferação de brotos (George, 1993).

A utilização do sistema de imersão temporária simultaneamente a adição de PBZ ao meio de cultura, teria como objetivo promover um alto incremento nas taxas de proliferação de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, como ocorre em outras culturas.

Quando cultivados em sistema de imersão temporária, brotos de abacaxizeiro submetidos aos tratamentos compostos por ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM); ANA (2,0 µM), BAP (4,0 µM) e PBZ (3,0 µM) e ANA (2,0 µM), BAP (4,0 µM) e PBZ (6,0 µM), apresentaram taxas de proliferação de 83,3, 100,8 e 183,4, respectivamente. Brotos submetidos aos mesmos tratamentos em sistema de micropropagação convencional, apresentaram taxas de multiplicação em torno de 6,0 brotos por explante (Sérgio Feuser, informação pessoal). Espécies do gênero *Aechmea* tiveram incremento em suas taxas de multiplicação, após 60 dias de cultivo em imersão temporária e tratamentos com paclobutrazol (Daquinta *et al.*, 1999). Explantes de banana cultivados em imersão temporária tiveram taxa de multiplicação superior (5,0) aos explantes cultivados em sistemas convencionais de micropropagação (2,1) (Alvard & Teisson, 1993).

No presente trabalho, em sistema convencional de micropropagação, a presença do paclobutrazol no meio de cultura elevou consideravelmente as taxas de proliferação de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, em relação aos demais tratamentos. No

sistema de imersão temporária, o tratamento composto por ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM) promoveu maiores taxas de proliferação de brotos, seguido pelo tratamento composto por ANA (2,0 μM), BAP (4,0 μM) e PBZ (3,0 μM). Esses fatos sugerem que apenas a presença de paclobutrazol em sistema de micropropagação convencional pode ser suficiente para promover incremento na taxa de multiplicação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, caracterizando uma vantagem na redução dos custos de implantação de um sistema de micropropagação em que se utilizaria o sistema de imersão temporária, substituindo-o pela utilização de PBZ em sistema convencional, reduzindo-se também as perdas por contaminação, freqüentes em sistemas de imersão temporária. Por outro lado, o uso do sistema de imersão temporária sem retardantes de crescimento também pode promover incrementos em taxas de multiplicação, como ocorreu em culturas de abacaxizeiro (Sérgio Feuser, informação pessoal) e banana (Alvard & Teisson, 1993). Os dados da Tabela 5 apresentam, comparativamente, as taxas médias de proliferação de brotos por plântula de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em sistema de imersão temporária e em sistema convencional.

Tabela 3. Taxa de proliferação de brotos, diâmetro e altura de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em sistema convencional, em resposta aos fitoreguladores de ANA, BAP e PBZ (μMol) adicionados ao meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), 90 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, $P < 0,05$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Tratamentos			Proliferação de brotos	Diâmetro (mm)	Altura (mm)
ANA (μM)	BAP (μM)	PBZ (μM)			
0,0	0,0	0,0	6,13 C	2,36 A	24,26 A
2,0	4,0	0,0	11,13 B	2,12 AB	19,64 AB
2,0	4,0	3,0	20,10 A	1,62 BC	18,00 B
0,0	0,0	3,0	26,16 A	1,34 C	11,34 C
CV (%)			10,18	10,90	9,95

Tabela 4. Número de aglomerados totais e taxa de proliferação de brotos por aglomerado inicial de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em sistema de imersão temporária, em resposta aos fitoreguladores ANA, BAP e PBZ (μMol) adicionados ao meio de cultura MS, 90 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, $P < 0,05$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Tratamentos			Número de aglomerados totais	Proliferação de brotos*
ANA (μM)	BAP (μM)	PBZ (μM)		
0,0	0,0	0,0	9,75 AB	25,50 A
2,0	4,0	0,0	17,00 A	50,00 A
2,0	4,0	3,0	6,75 AB	34,20 A
0,0	0,0	3,0	4,00 B	7,25 B

*-Kruskal-Wallis

CV (%) – 19,16

Tabela 5. Taxa média de proliferação de brotos por broto de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em sistema de imersão temporária e em sistema convencional, em resposta aos fitoreguladores ANA, BAP e PBZ (μMol) adicionados ao meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), 90 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, $P < 0,05$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Tratamentos			Imersão temporária	Sistema convencional
ANA (μM)	BAP (μM)	PBZ (μM)		
0,0	0,0	0,0	8,50 A	6,13 C
2,0	4,0	0,0	16,66 A	11,13 B
2,0	4,0	3,0	11,40 A	20,10 A
0,0	0,0	3,0	2,41 B	26,11 A

6. MICROPROPAGAÇÃO DE *VRIESEA FRIBURGENSIS* VAR. *PALUDOSA* A PARTIR DE MICROGEMAS.

Quando cultivadas *in vitro*, durante a germinação, em meio basal semi-sólido, ou na multiplicação em meio basal líquido suplementado com ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), as espécies *Tillandsia gardneri*, *Vriesea platynema*, *Vriesea reitzii* e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, apresentam o desenvolvimento espontâneo de massas celulares nodulares (Figura 3) semelhantes a protocormóides, denominadas neste trabalho como microgemas. Essas massas nodulares formadas espontaneamente a partir de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas em meio basal líquido suplementado com ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), quando isoladas e cultivadas, evoluíram para uma grande quantidade de eixos caulinares. Para tanto, foram delineados experimentos visando a multiplicação e crescimento desses explantes avaliando-se o efeito de diferentes fitoreguladores – AG₃, ANA, BAP, 2,4-D, KIN e 2IP – sobre o peso de microgemas e o número de plântulas desenvolvidas a partir dessas massas nodulares.

6.1. MULTIPLICAÇÃO DE *VRIESEA FRIBURGENSIS* VAR. *PALUDOSA* A PARTIR DE MICROGEMAS.

No presente ensaio avaliou-se o efeito de diferentes fitoreguladores, ANA, BAP, AG₃, 2,4-D e KIN sobre a multiplicação de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.1.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas isoladas de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* em meio de cultura basal líquido adicionado de ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), foram isoladas e cultivadas em tubos de ensaio (150 x 25 mm), fechados com tampas de alumínio, contendo 15 ml de meio de cultura basal semi-sólido adicionado de diferentes fitoreguladores compondo os seguintes tratamentos: meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores - testemunha; ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M); AG₃ (6,0 μ M); e 2,4-D (5,0 μ M) e KIN (1,0 μ M). Os tratamentos foram compostos por 30 repetições, sendo que cada repetição equivale a um tubo de ensaio contendo inicialmente 0,05 g de microgemas em 15

ml de meio de cultura. Foi avaliado o peso em gramas de microgemas em cada repetição, 60 dias após a inoculação. Os dados foram transformados em $\log(x+2)$ e o experimento foi avaliado por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK 5,0 %).

6.1.2. RESULTADOS

Passados 60 dias da inoculação, quando submetidas ao tratamento isento de fitoreguladores e ao tratamento composto por ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM), as microgemas obtiveram maior incremento de peso, 2,42 e 2,24 g, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si e diferindo dos demais tratamentos, como indica a Tabela 6. O tratamento AG₃ (6,0 μM) promoveu um peso médio de 1,59 g, diferindo estatisticamente do tratamento composto por 2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM). A Tabela 6 apresenta os incrementos médios sobre o peso inicial das microgemas, promovidos pelos tratamentos.

O alto incremento ocorrido no peso inicial das microgemas não promoveu diferenciação das mesmas, como demonstra a Figura 3 (p. 59). O fato de o tratamento isento de fitoreguladores promover maior aumento de peso das microgemas em relação aos demais tratamentos, sugere a presença de um fator endógeno promotor deste padrão morfogênico intermediário entre a organogênese e a embriogênese. O 2,4-D, presente no tratamento composto por 2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM), pode ter promovido alterações morfogênicas sobre as microgemas, causando anomalias em estruturas organogênicas, e induzindo à formação de massas celulares, demonstradas na Figura 3g.

Tabela 6. Peso médio (g) e incremento médio sobre o peso inicial de microgemas de *V. friburgensis* var. *paludosa*, cultivadas *in vitro*, promovido pelos tratamentos: meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores, ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM), AG₃ (6,0 μM) e 2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM), adicionados ao meio de cultura basal semi-sólido, aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, $P < 0,05$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Tratamento	Peso Inicial (g)	Peso aos 60 dias (g)	Incremento (vezes)
Isento de fitoreguladores	0,05	2,42 A	48,48
ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM)	0,05	2,24 A	44,96
AG ₃ (6,0 μM)	0,05	1,59 B	31,95
2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM)	0,05	0,13 C	2,70
CV (%)		16,42	

6.2. FORMAÇÃO DE MASSAS CELULARES EMBRIOGÊNICAS EM MICROGEMAS DE *VRIESEA FRIBURGENSIS* VAR. PALUDOSA.

O presente ensaio foi estabelecido com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações 2,4-D e KIN em microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.2.1. MATERIAL E MÉTODOS

Como explantes foram utilizadas microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* em meio de cultura basal semi-sólido. Os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo 25 ml de meio de cultura basal semi-sólido adicionado de diferentes fitoreguladores em combinação, compondo os seguintes tratamentos: meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores – testemunha; 2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM); 2,4-D (10,0 μM) e KIN (1,0 μM); e 2,4-D (20,0 μM) E KIN (1,0 μM).

Os tratamentos foram compostos por 20 repetições, sendo que cada repetição equivaleu à uma placa de Petri contendo 9 explantes (0,05 g) em 25 ml de meio de cultura. Foi avaliada a percentagem de explantes com indução morfogênica em cada repetição, 90 dias após a inoculação. Os dados foram transformados em raiz ($x+0,5$) e o experimento foi avaliado por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK, 5,0 %).

6.2.2. RESULTADOS

Passados 90 dias da inoculação, microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* submetidas à diferentes concentrações de 2,4-D, resultaram na formação de massas celulares globulares de coloração amarela, semelhantes às células formadas em regiões periféricas de bases foliares de plantas micropropagadas de *Vriesea reitzii*.

O tratamento composto por 2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM) promoveu maior percentagem de explantes com indução de calos (91,11 %), seguido pelo tratamento composto por 2,4-D (10,0 μM) e KIN (1,0 μM) (90,47 %) e pelo tratamento composto por 2,4-D (20,0 μM) E KIN (1,0 μM) (88,33 %), respectivamente. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos compostos por 2,4-D e KIN, para percentagem de explantes com indução celular, como demonstram os dados apresentados na Tabela 7, sendo que estes diferiram do tratamento isento de fitoreguladores (64,44 %).

A formação de massas celulares resultou em necrose nas folhas em desenvolvimento dos explantes. Os setores dos explantes submetidos ao 2,4-D que não sofreram necrose, apresentaram deformações, com características de hiperidricidade, como espessamento foliar (Figura 3 g), não havendo desenvolvimento dos mesmos.

Tabela 7. Percentagem média de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* com calos embriogênicos, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de 2,4-D e KIN (1,0 μ M), em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, $P < 0,05$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Tratamentos		Indução (%)
2,4-D (μ M)	KIN (μ M)	
5,0	1,0	91,11 A
10,0	1,0	90,47 A
20,0	1,0	88,33 A
0,0	0,0	64,44 B
CV (%)		13,58

6.3. MULTIPLICAÇÃO DE *VRIESEA FRIBURGENSIS* VAR. *PALUDOSA*, A PARTIR DE MICROGEMAS, EM RESPOSTA À DISTINTAS COMBINAÇÕES DE FITOREGULADORES

Neste ensaio avaliou-se o efeito do ANA, BAP, KIN e 2IP sobre a multiplicação de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas em diferentes tratamentos.

6.3.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* sob os tratamentos compostos por ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M); AG₃ (6,0 μ M) adicionados ao meio de cultura basal semi-sólido e pelo tratamento composto pelo meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores (experimento anterior), foram submetidas à novos tratamentos, compostos por fitoreguladores em combinação ou isoladamente: meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores - testemunha; ANA (12,0 μ M); BAP (12,0 μ M); ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M); KIN (12,0 μ M); 2IP (12,0 μ M), adicionados ao meio de cultura basal semi-sólido. Foram inoculados 0,10 g de microgemas em tubos de ensaio contendo 15,0 ml de meio de cultura.

Cada tratamento foi composto por dez repetições, equivalentes à um tubo de ensaio. Passados 60 dias, os valores de peso em gramas das microgemas em cada repetição foram transformados em log (x+2) e avaliado por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK, 5,0 %). O experimento caracteriza-se como bifatorial pois considera dois grupos de tratamentos.

6.3.2. RESULTADOS

Não houve, aos 60 dias após a inoculação, diferenças estatisticamente significativas entre as médias de peso (g) de microgemas dos tratamentos 2IP (12,0 μ M), BAP (12,0 μ M), KIN (12,0 μ M), ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), ANA (12,0 μ M) e o meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores, sendo que 2IP (12,0 μ M) promoveu maior incremento sobre o peso inicial das microgemas, como demonstram os dados da Tabela 8. Explantes submetidos ao tratamento BAP (12,0 μ M) apresentaram sinais de hiperidricidade (Figura 3g). O tratamento-origem dos explantes ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M) promoveu maior incremento sobre o peso inicial (2,91 g), diferindo estatisticamente do tratamento

isento de fitoreguladores e do tratamento AG₃ (6,0 µM), com 2,10 e 2,03 g, respectivamente. Não houve interação estatisticamente significativa entre os tratamentos e a origem dos explantes.

Tabela 8. Peso médio (g) de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM); AG₃ (6,0 µM), e meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes tratamentos: meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores, 2IP (12,0 µM), KIN (12,0 µM), BAP (12,0 µM), ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM), ANA (12,0 µM) adicionados ao meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, P < 0,05). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Tratamentos	Peso (g)	
2IP (12,0 µM)	2,85	A
BAP (12,0 µM)	2,52	A
KIN (12,0 µM)	2,50	A
ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM)	2,48	A
Meio de cultura isento de fitoreguladores	1,94	A
ANA (12,0 µM)	1,79	A
CV (%)	25,99	

6.4. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE VRIESEA FRIBURGENSIS VAR. PALUDOSA IN VITRO.

Neste ensaio avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de AG₃ sobre o crescimento de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.4.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* em meio de cultura basal semi-sólido, foram submetidas à diferentes concentrações de AG₃ – 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM - adicionadas ao mesmo meio de cultura. Em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura, foram inoculados 0,05 mg de microgemas.

Cada tratamento foi composto por 20 repetições, equivalentes a um tubo de ensaio. Passados 60 dias, os valores de peso em gramas das microgemas em cada repetição foram transformados em raiz ($x+0,5$) e foi avaliado por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK 5 %).

6.4.2. RESULTADOS

Microgemas obtiveram, aos 60 dias da inoculação, maior ganho de peso – 1,73 g – quando submetidas ao tratamento sem fitoregulador, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos como demonstram os dados apresentados na Tabela 9. AG₃ nas concentrações 5,0 e 10,0 µM promoveram o segundo e terceiro maior ganho de peso, 1,17 e 0,99g respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si e diferindo dos demais tratamentos. Microgemas submetidas ao AG₃ na concentração 15,0 µM, obtiveram menor ganho de peso (0,69 g) diferindo este dos demais tratamentos. Os incrementos médios sobre o peso inicial de microgemas estão apresentados na Tabela 9.

Como no experimento 6.1 (p.36), a ausência de fitoreguladores propiciou um alto incremento sobre o peso inicial das microgemas em relação aos demais tratamentos, sugerindo novamente a presença de um fator endógeno que possibilite a expressão morfogênica nesses explantes. A concentração crescente de giberelina no meio de cultura basal promoveu diminuição no incremento sobre o peso inicial das microgemas, podendo este fato ser atribuído à um efeito de toxicidade, também caracterizado pela ocorrência de

necrose, no estágio inicial de desenvolvimento desses explantes. Nenhum dos tratamentos promoveu a diferenciação das microgemas em brotos.

Tabela 9. Peso médio (g) e incremento sobre o peso inicial de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, cultivadas *in vitro* em meio de cultura basal semi-sólido, suplementado com diferentes concentrações de AG₃, 60 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, P < 0,05). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

AG ₃ (μM)	Peso Inicial (g)	Peso aos 60 dias (g)	Incremento (X)
0,0	0,05	1,73 A	34,60
5,0	0,05	1,17 B	23,40
10,0	0,05	0,99 B	19,80
15,0	0,05	0,69 C	13,80
CV %		11,41	

6.5. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE *VRIESEA FRIBURGENSIS* MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA BASAL ISENTO DE FITOREGULADOR.

No presente ensaio avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de AG₃ sobre o crescimento de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.5.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* em meio de cultura basal semi-sólido foram submetidas à tratamentos contendo diferentes concentrações de AG₃ – 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM - adicionadas ao meio de cultura basal líquido. Sobre ponte de pape filtro (Whatman nº 3), foram inoculados 0,10 g de microgemas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura.

Cada tratamento foi composto por 30 repetições, equivalentes a um tubo de ensaio. Passados 60 dias, os valores de peso em gramas das microgemas em cada repetição foram transformados em raiz ($x+0,5$), o número de brotos e o número de brotos/g foram transformados em log (x) e foram avaliados por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK, 5%).

6.5.2. RESULTADOS

Microgemas multiplicadas em meio de cultura basal isento de fitoregulador, quando submetidas aos tratamentos para crescimento e mantidas em meio de cultura líquido sobre ponte de papel, tiveram comportamento distinto das microgemas submetidas aos mesmos tratamentos, porém mantidas em meio de cultura semi-sólido (Experimento 6.4, p.42). No experimento anterior, assim como no experimento 6.1 (multiplicação de microgemas), a ausência de fitoregulador mostrou-se o melhor tratamento para o incremento sobre o peso de microgemas, não ocorrendo o mesmo neste experimento.

Os dados de incremento sobre o peso inicial das microgemas, os pesos médios promovidos por cada tratamento, o número médio total de brotos convertidas e o número de brotos por grama obtido em cada tratamento, estão apresentados na Tabela 10.

O tratamento AG₃ (5,0 μM) promoveu maior peso de microgemas (1,37 g) não diferindo do tratamento AG₃ (15,0 μM) (1,17 g) e diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. O tratamento AG₃ (15,0 μM) não diferiu do tratamento AG₃ (10,0 μM) (1,02 g), diferindo do tratamento sem fitoregulador (0,90). Os tratamentos AG₃ (10,0 μM) e sem fitoregulador não diferiram estatisticamente.

Todos os tratamentos promoveram a diferenciação das microgemas em brotos, mesmo havendo baixo incremento no peso médio em relação aos experimentos anteriores. O tratamento AG₃ (5,0 μM) promoveu o maior número médio total de microgemas convertidas em brotos (236,16) não diferindo estatisticamente do tratamento AG₃ (15,0 μM) (202,26) e diferindo dos demais tratamentos. Os tratamentos AG₃ (15,0 μM) e AG₃ (10,0 μM) (165,13) não diferenciaram-se, e o tratamento sem fitoregulador (156,56) não diferenciou-se do tratamento AG₃ (10,0 μM), diferindo do tratamento AG₃ (15,0 μM).

O tratamento sem fitoregulador promoveu maior conversão de brotos por grama (193,24), não havendo diferença estatisticamente significativa entre as médias dos tratamentos.

Tabela 10. Peso médio (g), incremento médio sobre o peso inicial (0,10 g) de microgemas, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* em resposta à diferentes concentrações de AG₃, adicionadas ao meio de cultura basal líquido, aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, P < 0,05). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

AG ₃ (μM)	Peso (g)	Incremento (X)	Nº total de brotos	Nº brotos/g
0,0	0,90 C	9,0	156,56 C	193,24 A
5,0	1,37 A	13,70	236,16 A	170,10 A
10,0	1,02 BC	10,20	165,13 BC	172,04 A
15,0	1,17 AB	11,70	202,26 AB	157,27 A
CV (%)	14,41		8,50	5,0

6.6. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE *VRIESEA FRIBURGENSIS* VAR. PALUDOSA MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM ANA.

No presente ensaio avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de AG₃ sobre o crescimento de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.6.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* em meio de cultura basal semi-sólido suplementado com ANA na concentração de 12,0 µM, foram submetidas à diferentes concentrações de AG₃ – 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM - adicionadas ao meio de cultura basal líquido. Sobre ponte de papel, foram inoculados 0,10 g de microgemas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura.

Cada tratamento foi composto por 30 repetições, equivalentes a um tubo de ensaio. Passados 60 dias, os valores de peso em gramas das microgemas em cada repetição foram transformados em raiz ($x+0,5$), o número de brotos e o número de brotos/g foram transformados em log (x) e foram avaliados por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK, 5%).

6.6.2. RESULTADOS

Microgemas multiplicadas em meio de cultura basal suplementado com ANA, quando submetidas à diferentes concentrações de AG₃ para crescimento, obtiveram maior ganho de peso, em resposta à concentração 15,0 µM (0,80 g). Quando submetidas ao tratamento AG₃ (10,0 µM), microgemas obtiveram peso de 0,99 g. Microgemas submetidas aos tratamentos AG₃ (5,0 µM) e ao tratamento sem fitoregulador obtiveram pesos de 0,90 e 0,80 g, respectivamente. Não houve, no entanto, diferenças estatisticamente significativas (Tabela 11).

Todos os tratamentos promoveram a conversão das microgemas em brotos. Os tratamentos AG₃ (5,0 µM) e AG₃ (10,0 µM) promoveram maiores números médios totais de brotos, 107,30 e 104,03 respectivamente, não havendo diferenças estatisticamente significativas, entre as médias de tratamento.

Os tratamentos AG₃ (10,0 µM) e AG₃ (5,0 µM) propiciaram maior conversão de microgemas em brotos por grama, 118,52 e 117,34, respectivamente. O número de brotos convertidas por grama de microgemas em cada tratamento não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

Os dados de incremento sobre o peso inicial das microgemas, os pesos médios promovidos por cada tratamento, o número médio total de brotos convertidas e o número de brotos por grama obtido em cada tratamento, estão apresentados na Tabela 11.

Os aglomerados de microgemas, multiplicados no tratamentos ANA (12,0 µM) apresentaram calosidades, raízes e brotos hiperídricas, diferenciando-se qualitativamente dos demais tratamentos. A utilização de ANA em concentração elevada, assim como a presença de 2,4-D, em meio de cultura para multiplicação de microgemas, parece afetar o desenvolvimento das mesmas, causando anomalias morfológicas.

Tabela 11. Peso médio (g), incremento médio sobre o peso inicial (0,10 g) de microgemas, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* em resposta à diferentes concentrações de AG₃, adicionadas ao meio de cultura basal líquido, aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, P < 0,05). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

AG ₃ (µM)	Peso (g)	Incremento (X)	Nº total de brotos	Nº brotos / g
0,0	0,80 A	8,00	83,33 A	100,52 A
5,0	0,90 A	9,00	107,30 A	117,34 A
10,0	0,89 A	8,90	104,03 A	118,52 A
15,0	0,80 A	8,00	92,20 A	111,15 A
CV (%)	7,5		9,3	7,6

6.7. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE VRIESEA FRIBURGENSIS VAR. PALUDOSA MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM AG₃

No presente ensaio avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de AG₃ sobre o crescimento de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.7.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* em meio de cultura basal semi-sólido suplementado com AG₃ na concentração 6,0 µM, foram submetidas à diferentes concentrações de AG₃ – 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM - adicionadas ao meio de cultura basal líquido. Sobre ponte de papel, foram inoculados 0,10 g de microgemas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura.

Cada tratamento foi composto por 30 repetições, equivalentes a um tubo de ensaio. Passados 60 dias, os valores de peso em gramas das microgemas em cada repetição foram transformados em raiz ($x+0,5$), o número de brotos e o número de brotos/g foram transformados em log (x) e foram avaliados por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK, 5%).

6.7.2. RESULTADOS

Diferentes concentrações de AG₃, utilizadas para o crescimento das microgemas multiplicadas sob o tratamento AG₃ (6,0 µM), promoveram baixo incremento sobre o peso inicial, não diferenciando-se estatisticamente entre si. Os incrementos sobre o peso inicial das microgemas, os pesos médios promovidos por cada tratamento, o número médio total de brotos convertidas e o número de brotos por grama obtido em cada tratamento, estão descritos na Tabela 12.

O tratamento AG₃ (15,0 µM) promoveu maior ganho de peso (0,80 g), seguido pelo tratamento AG₃ (10,0 µM) que promoveu ganho de peso de 0,73 g. O tratamento sem fitoregulador e o tratamento AG₃ (5,0 µM) propiciaram o desenvolvimento de maciços com pesos de 0,71 e 0,67 g, respectivamente.

Todos os tratamentos propiciaram a conversão das microgemas em brotos. O tratamento AG₃ nas concentrações 15,0, 10,0 e 5,0 µM, permitiu a obtenção de valores

médios mais elevados para número de brotos convertidas: 182,16, 170,13 e 163,50, respectivamente, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre si. O tratamento AG₃ (15,0 µM) diferenciou-se estatisticamente do tratamento sem fitoreguladores (116,7 brotos).

Houve maior conversão de brotos por grama, quando as microgemas foram submetidas ao tratamento AG₃, nas concentrações 15,0, 5,0 e 10,0, observando-se valores de 295,51, 285,24 e 248,06 brotos, respectivamente, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as médias destes tratamentos. O tratamento sem fitoregulador (173,04 brotos por grama) diferiu estatisticamente dos demais tratamentos.

Tabela 12. Peso médio (g), incremento médio sobre o peso inicial (0,10 g) de microgemas, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* em resposta à diferentes concentrações de AG₃, adicionadas ao meio de cultura basal líquido, aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, P < 0,05). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

AG ₃ (µM)	Peso (g)	Incremento (X)	Nº total de brotos	Nº brotos / g
0,0	0,71 A	7,10	116,70 B	173,04 B
5,0	0,67 A	6,70	163,50 AB	285,24 A
10,0	0,73 A	7,30	170,13 AB	248,06 A
15,0	0,80 A	8,00	182,16 A	295,51 A
CV (%)	17,36		9,90	7,11

6.8. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE VRIESEA FRIBURGENSIS VAR. PALUDOSA MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM ANA E BAP.

Neste ensaio, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de AG₃ sobre o crescimento de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.8.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* em meio de cultura basal semi-sólido suplementado com o tratamento ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM), foram submetidas à diferentes concentrações de AG₃ – 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM - adicionadas ao meio de cultura basal líquido. Sobre ponte de papel, foram inoculados 0,10 g de microgemas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura.

Cada tratamento foi composto por 30 repetições, equivalentes a um tubo de ensaio. Passados 60 dias, os valores de peso em gramas das microgemas em cada repetição foram transformados em raiz ($x+0,5$), o número de brotos e o número de brotos/g foram transformados em log (x) e foram avaliados por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK 5%).

6.8.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microgemas multiplicadas em meio de cultura basal suplementado com ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM), quando submetidas à diferentes concentrações de AG₃, obtiveram maior incremento sobre o peso inicial frente ao tratamento sem fitoregulador (1,13 g). Não houve, contudo diferenças estatisticamente significativas, entre as médias dos tratamentos.

O tratamento AG₃ nas concentrações 10,0 e 5,0 e o tratamento sem fitoregulador, promoveram números médios totais de brotos convertidos de 231,86, 218,40 e 200,23 respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. O tratamento AG₃ (15,0 µM) promoveu a conversão de 161,26 brotos não diferindo estatisticamente do tratamento sem fitoregulador, e diferindo dos demais tratamentos.

Quando submetidas ao tratamento AG₃ (5,0 µM), microgemas obtiveram maior número de brotos convertidos por grama (210,74), não diferindo estatisticamente do

tratamento AG₃ (10,0 μM), que promoveu a conversão de 197,86 brotos por grama e diferindo dos demais tratamentos. O tratamento AG₃ (15,0 μM) e o tratamento sem fitoregulador promoveram a conversão de 178,74 e 173,63 brotos por grama, respectivamente, não diferiram estatisticamente entre si.

Os dados de incremento sobre o peso inicial das microgemas, os pesos médios promovidos por cada tratamento, o número médio total de brotos convertidas e o número de brotos por grama obtido em cada tratamento, estão apresentados na Tabela 13. O desenvolvimento das microgemas e a diferenciação de brotos, ao longo de 100 dias, encontra-se representado nas Figuras 4 b-f.

Tabela 13. Peso médio (g), incremento médio sobre o peso inicial (0,10 g) de microgemas, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* em resposta à diferentes concentrações de AG₃, adicionadas ao meio de cultura basal líquido, aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, P < 0,05). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

AG ₃ (μM)	Peso (g)	Incremento (X)	Nº total de brotos	Nº brotos/g
0,0	1,13 A	11,13	200,23 AB	173,63 B
5,0	1,10 A	11,00	218,40 A	210,74 A
10,0	1,12 A	11,20	231,86 A	197,86 A
15,0	0,98 A	9,80	161,26 B	178,74 B
CV (%)	11,37		7,52	4,49

6.9. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE VRIESEA FRIBURGENSIS VAR. PALUDOSA MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM KIN.

No presente ensaio, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de AG₃ sobre o crescimento de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.9.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com KIN na concentração de 12,0 µM, foram submetidas à diferentes concentrações de AG₃ – 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM - adicionadas ao meio de cultura basal líquido. Sobre ponte de papel, foram inoculados 0,10 g de microgemas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura.

Cada tratamento foi composto por 30 repetições, equivalentes a um tubo de ensaio. Passados 60 dias, os valores de peso em gramas das microgemas em cada repetição foram transformados em raiz ($x+0,5$), o número de brotos e o número de brotos/g foram transformados em log (x) e foram avaliados por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK 5,0 %).

6.9.2. RESULTADOS

Microgemas multiplicadas em meio de cultura suplementado com o tratamento KIN (12,0 µM), quando submetidas à diferentes concentrações de AG₃, obtiveram maior incremento sobre o peso inicial frente ao tratamento AG₃ (15,0 µM) e ao tratamento sem fitoregulador, com pesos médios de 0,61 e 0,59 g, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si e diferindo dos demais tratamentos. Com pesos médios de 0,43 e 0,41 g, AG₃ nas concentrações 10,0 e 5,0 µM, não diferiram estatisticamente entre si. Os dados relativos aos incrementos sobre o peso inicial das microgemas, os pesos médios promovidos por cada tratamento, o número médio total de brotos convertidas e o número de brotos por grama obtido em cada tratamento, são apresentados na Tabela 14. A Figura 4a demonstra a regeneração de brotos submetidas ao tratamento AG₃ (5,0 µM), aos 30 dias. A mesma Figura mostra formação de estruturas globulares em microgemas, ainda que tenha ocorrido como caso isolado, sob esse tratamento.

Todos os tratamentos propiciaram a conversão de microgemas em brotos, sendo que o tratamento AG₃ (15,0 µM) e o tratamento sem fitoregulador, promoveram maior número médio total de brotos convertidas, 135,6 e 133,1 respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si e nem do tratamento AG₃ (10,0 µM), com média de 97,53 brotos convertidas e diferindo do tratamento AG₃ (5,0 µM), que propiciou a conversão de 83,10 brotos. Os tratamentos AG₃ (10,0 µM) e AG₃ (5,0 µM), não diferiram estatisticamente entre si.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias de tratamento para o número de brotos convertidas por grama de microgemas, sendo que o tratamento sem fitoregulador promoveu a maior conversão de brotos, com média de 257,42 brotos por grama.

Tabela 14. Peso médio (g), incremento médio sobre o peso inicial (0,10 g) de microgemas, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* em resposta à diferentes concentrações de AG₃, adicionadas ao meio de cultura basal líquido, aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste SNK, P<0,05). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

AG ₃ (µM)	Peso (g)	Incremento (X)	Nº total de brotos	Nº brotos/g
0,0	0,59 A	5,90	133,10 A	257,42 A
5,0	0,41 B	4,10	83,10 B	212,65 A
10,0	0,43 B	4,30	97,53 AB	229,58 A
15,0	0,61 A	6,10	135,60 A	226,05 A
CV (%)	10,47		6,62	4,11

6.10. CRESCIMENTO DE MICROGEMAS DE VRIESEA FRIBURGENSIS VAR. PALUDOSA MULTIPLICADAS EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM 2IP.

No presente ensaio avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de AG₃ sobre o crescimento de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

6.10.1. MATERIAL E MÉTODOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas *in vitro* em meio de cultura basal semi-sólido suplementado com 2IP na concentração de 12,0 µM, foram submetidas à diferentes concentrações de AG₃ – 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM - adicionadas ao meio de cultura basal líquido. Sobre ponte de papel, foram inoculados 0,10 g de microgemas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura.

Cada tratamento foi composto por 30 repetições, equivalentes a um tubo de ensaio. Passados 60 dias, os valores de peso em gramas das microgemas em cada repetição foram transformados em raiz ($x+0,5$), o número de brotos e o número de brotos/g foram transformados em log (x) e foram avaliados por Análise de Variância e Teste de Separação de Médias (SNK, 5%).

6.10.2. RESULTADOS

Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas em meio de cultura basal líquido suplementado com o tratamento 2IP (12,0 µM), quando submetidas à diferentes concentrações de AG₃, obtiveram melhor incremento sobre o peso inicial frente ao tratamento sem fitoregulador e ao tratamento AG₃ (15,0 µM), com pesos médios de 0,90 e 0,85 g respectivamente. O tratamento sem fitoregulador não diferiu do tratamento AG₃ (15 µM), e diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Os pesos médios promovidos pelos tratamentos AG₃ (15,0 µM), AG₃ (10,0 µM) (0,72 g) e AG₃ (5,0 µM) (0,72 g), não diferiram estatisticamente.

Todos os tratamentos propiciaram a conversão de microgemas em brotos. O tratamento sem fitoregulador promoveu a conversão de maior número médio total de brotos (152,23) diferenciando-se estatisticamente dos demais tratamentos. Os números totais de

brotos convertidas promovidos pelos tratamentos AG₃ (15,0 μM) (127,13), AG₃ (5,0 μM) (120,0) e AG₃ (10,0 μM) (114,06), não diferiram estatisticamente.

Para o número de brotos convertidas por grama de microgemas, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias do tratamento sem fitoregulador (177,76), AG₃ (5,0 μM) (172,67) e AG₃ (10,0 μM) (171,46). Com média inferior (148,99 brotos por grama), o tratamento AG₃ (15,0 μM) diferiu estatisticamente dos demais tratamentos.

Os valores relativos aos incrementos sobre o peso inicial das microgemas, os pesos médios promovidos por cada tratamento, o número médio total de brotos convertidas e o número de brotos por grama obtido em cada tratamento, estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15. Peso médio (g), incremento médio sobre o peso inicial (0,10 g) de microgemas, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* em resposta à diferentes concentrações de AG₃, adicionadas ao meio de cultura basal semi-sólido, aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK, P < 0,05). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

AG ₃ (μM)	Peso (g)	Incremento (X)	Nº total de brotos	Nº brotos / g
0,0	0,90 A	9,00	152,23 A	177,76 A
5,0	0,72 B	7,20	120,00 B	172,67 A
10,0	0,72 B	7,20	114,06 B	171,46 A
15,0	0,85 AB	8,50	127,13 B	148,99 B
CV (%)	10,47		6,62	4,11

6.11. DISCUSSÃO - ASPECTOS GERAIS DA MORFOGÊNESE E MICROPROPAGAÇÃO DE MICROGEMAS.

O tratamento AG₃ (15,0 µM) promoveu a diferenciação de um maior número médio de brotos por grama (295,51) em microgemas mantidas anteriormente sob o tratamento AG₃ (6,0 µM). No entanto, foram considerados melhores tratamentos (utilizando-se como parâmetro a média de todos os tratamentos) aqueles que propiciaram o desenvolvimento de no mínimo 170,0 brotos/g, sendo que os aglomerados de microgemas apresentaram peso acima de 0,9 g. Os tratamentos que promoveram o desenvolvimento de aglomerados com baixo peso e elevado número de brotos/g – acima de 200 – não foram considerados eficientes em relação aos demais tratamentos. O baixo peso dos aglomerados foi atribuído à desidratação dos mesmos, detectada visualmente, durante o processo de diferenciação e crescimento *in vitro*. Deste modo, se os aglomerados apresentassem seu peso integral (anteriormente à desidratação), que poderia ser, de acordo com a média, entre 0,85 e 0,90 g, e mantendo-se o número de brotos contadas, o número de brotos por grama poderia ser semelhante aos promovidos pelos tratamentos selecionados e demonstrados na Tabela 16. A Figura 5 demonstra a rota estabelecida para a micropropagação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* a partir de microgemas.

A definição das concentrações de AG₃ utilizadas nos experimentos para crescimento, teve base nos resultados obtidos no experimento 6.4 (p. 41), onde o tratamento sem fitoregulador mostrou-se bastante eficiente, e as microgemas submetidas ao tratamento AG₃ (15,0 µM) apresentaram sinais de toxicidade, caracterizados por necrose na base dos aglomerados, a qual mantém contato direto com o meio de cultura. Observou-se no entanto, que nos experimentos para crescimento das microgemas, os aglomerados mantidos anteriormente sob os tratamentos meio de cultura basal sem fitoregulador, ANA (12,0 µM), AG₃ (6,0 µM), ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM), KIN (12,0 µM) e 2IP (12,0 µM), utilizados no experimento 6.3 (p. 39), apresentaram resultados semelhantes, com poucas diferenças estatisticamente significativas, em resposta às diferentes concentrações de AG₃. O experimento 6.3. também não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as médias de tratamento.

Os resultados sugerem que as concentrações de AG₃ utilizadas foram muito próximas, não sendo possível detectar diferenças significativas entre elas, em alguns

experimentos ou não exerceram efeito sobre o crescimento de microgemas, tendo este sido regido por fatores endógenos, considerando que a ausência de fitoreguladores no meio de cultura mostrou-se bastante eficiente na multiplicação e regeneração de brotos a partir de microgemas, e que estas surgem espontaneamente, durante a germinação de sementes em meio de cultura basal semi-sólido sem fitoreguladores ou em meio de cultura basal líquido suplementado com ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM), durante a multiplicação de brotos, como demonstram as Figuras 3 a e 3b.

Embora as microgemas tenham sido encontradas sem qualquer conexão com o explante que as originou, é muito provável que as microgemas desenvolveram-se em bases foliares de brotos micropropagadas, considerando-se que esses explantes são citados por Hosoki e Asahira (1980) como sendo de grande potencial regenerativo, pela presença de meristemas intercalados às vascularizações da região basal. Estruturas intermediárias na regeneração de brotos a partir de bases foliares são denominadas como protuberâncias (Mercier & Kerbauy, 1992, 1993), massas celulares (Mercier & Kerbauy, 1992), corpos protocormóides (Mapes, 1973), e nódulos (Teng, 1997). Seguindo este contexto, as microgemas podem ser definidas como estruturas intermediárias no desenvolvimento de brotos a partir de bases foliares, sem haver, no entanto, o isolamento desses explantes foliares.

Em explantes foliares de *V. fosteriana*, Mercier e Kerbauy (1992) observaram a formação de gemas adventícias apresentando protuberâncias (massas celulares). A maior taxa de multiplicação foi de 22,5 gemas por plântula, passado três meses de cultura em meio semi-sólido Knudson (1946) suplementado com ANA e BAP. Mercier e Kerbauy (1993) obtiveram gemas adventícias através de protuberâncias surgidas em bases foliares de brotos de *Dyckia macedoi* submetidas à diferentes combinações de ANA e BA. Em *Aechmea fasciata*, brotos foram diferenciados em calos de explantes foliares cultivados em meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com Cinetina e AIA ou com BA e ANA (Vinterhalter & Vinterhalter, 1994).

Mapes (1973), baseado em resultados obtidos em culturas de abacaxi, multiplicou *in vitro* sete espécies de bromélias ornamentais, das quais apenas três responderam positivamente ao meio Knudson modificado com leite de coco (20 %) e adenina. O meio de cultura promoveu o desenvolvimento de gemas laterais, ocorrendo também a indução e

crescimento de corpos globulares (corpos protocormóides), com subsequente desenvolvimento em brotos.

Na micropropagação de orquídeas os protocormóides representam um estágio precoce à embriogênese, sendo considerados representantes da embriogênese direta ou indireta, onde calos são considerados embriogênicos e os protocormóides são regenerados a partir deles (George, 1993). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que as microgemas não devem ser relacionadas aos protocormóides e nem à calos embriogênicos por que estes dão origem à brotos completas, com caule e raiz. As brotos diferenciadas a partir de microgemas possuem apenas parte aérea. Possivelmente, a rota morfogênica das microgemas relaciona-se a um processo organogênico direto, onde toda a massa celular submetida aos tratamentos para crescimento é convertida em brotos, não restando vestígios de calosidades que poderiam ser atribuídos ao processo organogênico indireto.

Teng (1997) desenvolveu um sistema de micropropagação para *Ananas comosus* utilizando-se cultura de nódulos, com alguns aspectos semelhantes à propagação de microgemas. Os nódulos foram desenvolvidos a partir de bases foliares em meio MS/2 suplementado com 2,7 – 5,4 μM de ANA e 4,4 μM de BAP. Estes mantiveram-se estáveis por longo período, proliferando-se em mais nódulos, sobre os nódulos velhos, quando segmentados e inoculados em meio de mesma composição. No presente trabalho, na cultura de microgemas, também ocorre a multiplicação de microgemas sobre microgemas, em larga escala, não havendo, no entanto, sincronização do período de manutenção das microgemas neste mesmo estágio. Quando submetidos à tratamentos com ANA e BAP, os nódulos regeneraram brotos, em quinze dias. A capacidade regenerativa dos nódulos (125 brotos/g) é superior à organogênese direta ou à de calos (Teng, 1997). Esta capacidade reduz-se quando elevadas concentrações de ANA são adicionadas ao meio de cultura. McCown *et al.* (1988) encontrou nesses nódulos, três tipos de células: meristemáticas, parênquima e elementos vasculares; e duas camadas: epiderme e córtex interno. Teng (1997) caracterizou os nódulos como aglomerados de células que exibem padrão consistente de diferenciação interna de tecido e célula. De acordo com o autor, estas estruturas têm sido obtidas de um grande número de espécies herbáceas e arbóreas como abacaxi e eucalipto.

No presente trabalho, após um período de aproximadamente 60 dias, nenhum tratamento – ausência de fitoreguladores ou ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM) – foi eficiente na estabilização da fase inicial de desenvolvimento das microgemas, quando assemelham-se à calos friáveis. Passado este período, microgemas diferenciam-se em brotos. Os tratamentos com auxinas como 2,4-D e ANA, mantêm as microgemas por um período maior em seu estágio inicial, porém em sua diferenciação ocorreu necrose e hiperidricidade. A obtenção de novas microgemas a partir de brotos diferenciadas (a partir de microgemas) não ocorreu. Esses fatos tornaram inviável o estabelecimento de um protocolo de micropropagação cíclico. A grande vantagem desse sistema de propagação *in vitro*, é o alto potencial regenerativo das microgemas. Para a realização de todos os experimentos destinados à diferenciação e crescimento de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* a partir de microgemas, foram utilizados 72,0 g de inóculo. Passados 60 dias, o peso de todos os aglomerados aumentou, em média 8,5 vezes, atingindo 612,66 g. Foram diferenciadas 106.441 brotos que correspondem à 173,73 brotos por grama. Pode-se inferir ainda, que um grama de inóculo promoveu o desenvolvimento de 1478 brotos, ao fim de 60 dias. Outra vantagem, é o fato de todas as microgemas converterem-se em brotos, praticamente ao mesmo tempo, em todos os tratamentos, demonstrando uma sincronia no processo de desenvolvimento. A importância do sistema regenerativo baseado em microgemas refere-se ao fato de que, uma vez controlado o processo morfogênico *in vitro*, os protocolos regenerativos poderão ser testados em outras bromeliáceas, permitindo a propagação massal *in vitro* de espécies de interesse.

FIGURA 3. Multiplicação. a) Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* surgidas em brotos germinadas em meio de cultura basal semi-sólido e b) em brotos multiplicadas em meio de cultura basal líquido suplementado com ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M).

c) Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* isoladas e cultivadas em meio de cultura basal semi-sólido suplementado com ANA (12 μ M), aos 30 dias após a inoculação (7,5 x).

d, f) Corte longitudinal demonstrando tecido nodular originado a partir de parênquima, no qual diferenciam-se as microgemas, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com AG₃ (10 μ M), aos 30 dias após a inoculação (10 x).

e) Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* isoladas e cultivadas em meio de cultura basal semi-sólido isento de fitoreguladores, aos 30 dias após a inoculação (5,0 x).

g) Formação celular em microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* com estruturas globulares (1) e organogênicas, apresentando anomalias como espessamento foliar (2), em microgemas submetidas ao tratamento composto por 2,4-D (5 μ M) e KIN (1 μ M), em meio basal semi-sólido, aos 30 dias após a inoculação (10 x).

h) Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* apresentando sinais de hiperidricidade, quando submetidas ao tratamento BAP (12 μ M), aos 30 dias após a inoculação (10 x). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

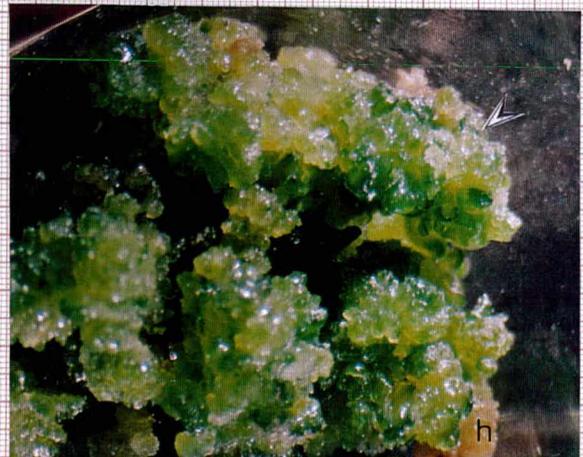
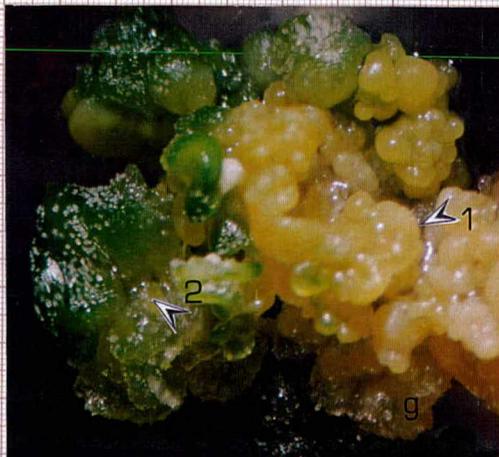
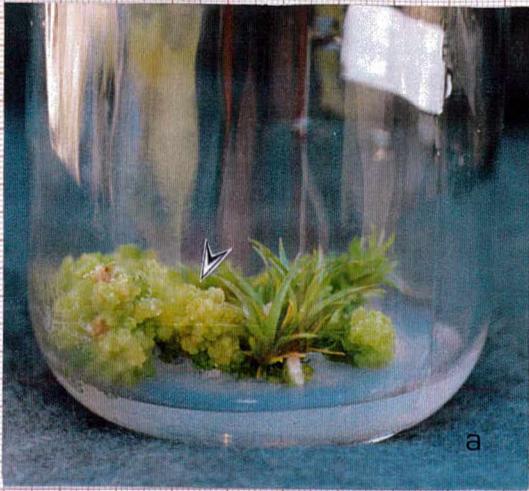


FIGURA 4. Crescimento. a) Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* multiplicadas em meio de cultura basal semi-sólido suplementado com KIN (12 μ M) e posteriormente submetidas ao tratamento AG₃ (5 μ M), adicionado ao meio de cultura basal semi-sólido, aos 30 dias após a inoculação (12,5 x), apresentando regeneração de brotos (1) e formação celular com estruturas globulares (2).

b) Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* multiplicadas em meio de cultura basal semi-sólido suplementado com ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M) e posteriormente submetidas ao tratamento AG₃ (10 μ M), adicionado ao meio de cultura basal líquido, aos 30 dias após a inoculação (10 x); c) aos 50 dias após a inoculação, apresentando regeneração de brotos (12,5 x); d) aos 70 dias após a inoculação, brotos com 0,5 cm de altura (12,5 x); e) aos 100 dias após a inoculação, brotos com altura superior a 1,0 cm (12,5 x).

f) Corte longitudinal demonstrando a regeneração de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a partir de microgemas, multiplicadas em meio de cultura basal semi-sólido suplementado com ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M) e posteriormente submetidas ao tratamento AG₃ (10 μ M), adicionado ao meio de cultura basal, aos 100 dias após a inoculação (40 x).
LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

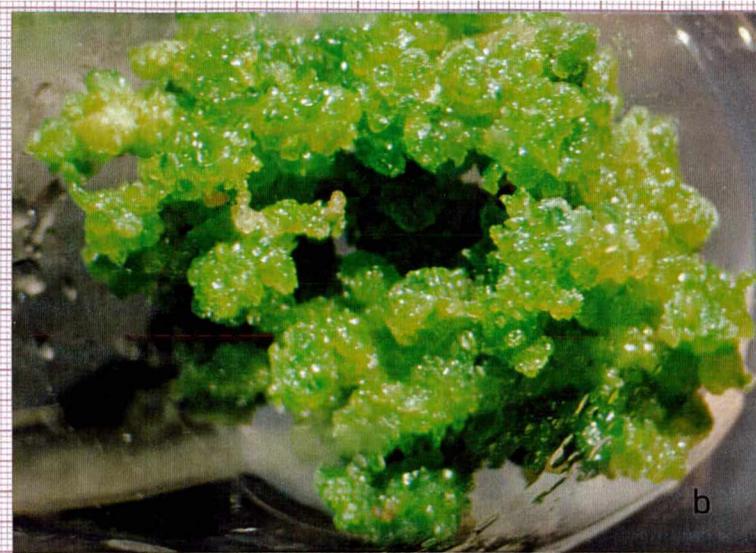


Figura 5. Rota para a micropropagação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* a partir de microgemas.

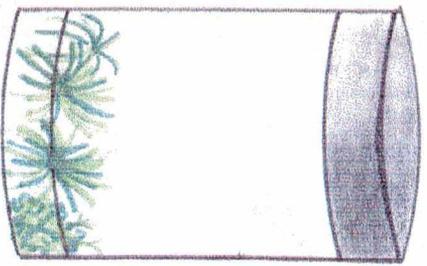
a) Desenvolvimento de microgemas (massas nodulares) a partir de brotos cultivadas, para multiplicação de brotos, em meio de cultura basal líquido suplementado com ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM).

b) Microgemas isoladas e cultivadas, por um período de 30 dias, para multiplicação, em meio basal semi-sólido suplementado, ou não, com ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM).

c) Crescimento das microgemas em meio de cultura basal líquido suplementado, ou não, com AG_3 nas concentrações de 5 a 15 μM , sobre ponte de papel, por um período de 60 dias.

d) Preparo para aclimatização das brotos, obtidas a partir das microgemas, em meio basal líquido, por um período de 30 dias.

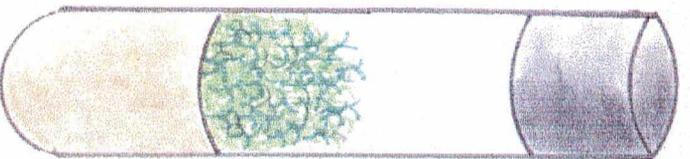
e) Aclimatização das brotos, em bandejas de isopor contendo pó de xaxim, sob condições de estufa. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.



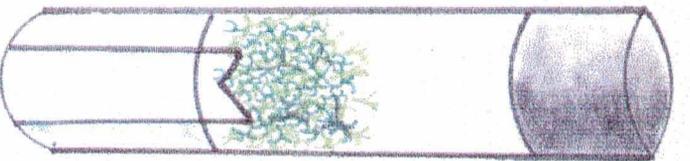
A) PLÂNTULAS
EM SISTEMA
CONVENÇIONAL DE
MICROPROPAGAÇÃO



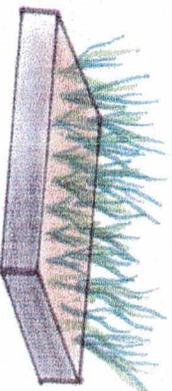
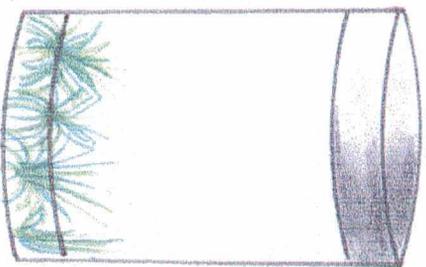
B) ISOLAMENTO
DE MICROGEMMAS
E MULTIPLICAÇÃO



C) ELONGAMENTO
SOBRE PONTE DE PAPEL



D) PREPARO PARA
ACLI MATIZAÇÃO



E) ACLI MATIZAÇÃO

ROTA PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* ATRAVÉS DE MICROGEMMAS.
LFDGV/CCA/UFSC/2000.

Tabela 16. Valores médios de peso (g), n° de brotos e n° de brotos/g de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado, ou não, com diferentes fitoreguladores, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µMol em meio de cultura basal líquido, 60 dias após a inoculação. As linhas destacadas representam os tratamentos mais eficientes. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

TRATAMENTOS (anteriores)	AG ₃ (µM)	PESO (g)	N° de BROTOS	BROTOS/g
ANA (12,0 µM)	15,0	2,75	92,2	111,15
Ausência de fitoreguladores	5,0	1,37	236,16	170,1
Ausência de fitoreguladores	15,0	1,18	202,26	175,27
ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM)	0,0	1,13	200,23	173,63
ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM)	10,0	1,12	231,87	197,87
ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM)	5,0	1,1	218,4	210,75
Ausência de fitoreguladores	10,0	1,02	165,13	172,04
ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM)	15,0	0,98	161,27	178,57
2IP (12,0 µM)	0,0	0,91	152,23	177,76
Ausência de fitoreguladores	0,0	0,91	156,56	193,24
ANA (12,0 µM)	5,0	0,9	107,3	117,24
ANA (12,0 µM)	10,0	0,89	104,03	118,52
2IP (12,0 µM)	15,0	0,85	127,13	148,99
AG ₃ (6,0 µM)	15,0	0,8	182,17	295,51
ANA (12,0 µM)	0,0	0,8	83,33	100,52
AG ₃ (6,0 µM)	10,0	0,73	170,13	248,06
2IP (12,0 µM)	5,0	0,72	120	172,67
2IP (12,0 µM)	10,0	0,72	114,06	171,46
AG ₃ (6,0 µM)	0,0	0,72	116,7	173,04
AG ₃ (6,0 µM)	5,0	0,67	163,5	285,25
KIN (12,0 µM)	15,0	0,61	135,6	226,05
KIN (12,0 µM)	0,0	0,59	133,1	257,42
KIN (12,0 µM)	10,0	0,43	97,53	229,58
KIN (12,0 µM)	5,0	0,41	83,1	212,66

7. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO NATURAL DE *VRIESEA FRIBURGENSIS* VAR. *PALUDOSA* POR MARCADORES ALOZÍMICOS.

Populações de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* são encontradas em hábito epífito, rupestre e terrestre, sendo heliófilas ou raramente de luz difusa e pouco exigentes à umidade do ar. Desenvolvem-se preferencialmente como terrestres, sobre os solos arenosos e secos da restinga litorânea, formando por vezes densos agrupamentos (Reitz, 1983).

Em Santa Catarina, esta espécie tem como área de dispersão os municípios de Blumenau, Campo Alegre, Florianópolis, Itajaí, Laguna, Lauro Müller, Palhoça, Porto Belo, Salete, São Francisco do Sul, São Joaquim e Sombrio. No Brasil, pode ser encontrada desde São Paulo ao Rio Grande do Sul. Apresenta pequeno valor endemiológico malarígeno, com positividade de 15 a 20%, devido à fatores ambientais desfavoráveis (exposição à luz direta e ventos) à um maior índice larvário (Reitz, 1983).

Com inflorescência de 50 a 230 cm de altura, *V. friburgensis* var. *paludosa* caracteriza-se como planta ornamental. Na restinga litorânea, quando exposta ao sol apresentam manchas roxas nas folhas e, no planalto estas ficam avermelhadas (Reitz, 1983).

Por seu valor ecológico e ornamental, e estando sujeita à ameaças pela devastação das matas e ao extrativismo ilegal, faz-se necessário, juntamente com as pesquisas para propagação massal, inserir *V. friburgensis* var. *paludosa*, assim como outras espécies de bromélias, num contexto de conservação de germoplasma e manejo *in situ*, partindo de sua caracterização genética.

Neste trabalho foi avaliada a variabilidade genética, através de marcadores alozímicos, de uma população natural de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, localizada em dunas na praia do Campeche, em Florianópolis (SC). Para tanto, foram estimadas frequências alélicas, porcentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco, heterozigosidade e índice de fixação.

7.1. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras foliares de 60 indivíduos adultos – possuindo haste floral, tomados aleatoriamente, sem critérios de distância mínima. Deste modo, indivíduos próximos ou não podiam compor a amostra desde que não pertencessem à mesma colônia – formada por indivíduos irmãos reproduzidos vegetativamente por rebentos. Os indivíduos amostrados foram encontrados em hábitos terrestre e epífita.

A coleta foi realizada em uma área de 1 hectare (50 x 200 m), situada nas dunas da praia do Campeche, em Florianópolis, SC. Além de *V. friburgensis* var. *paludosa*, espécies dos gêneros *Aechmea* e *Dyckia* ocorrem na região.

Tecidos para eletroforese de isoenzimas

Conforme as recomendações de Alfenas *et al.* (1991), foram coletadas amostras foliares a partir da região central da planta, onde as folhas são mais jovens, as quais foram mantidas em sacos plásticos dentro de recipientes com gelo para transporte ao laboratório. Uma vez no laboratório, foram mantidas em geladeira (5 a 10 °C) até sua utilização, pelo período de até uma semana.

Extração de Enzimas e Carregamento do Gel

Para a extração das enzimas foram utilizadas amostras de aproximadamente 20 mg de tecido foliar, maceradas com aproximadamente 7 mg de Polivinil Polipirrolidona, 10 mg de areia de rio lavada (48 horas em água corrente, 24 horas em ácido sulfúrico 5 N, seguido de 48 horas em água corrente) e 100 µl de solução extratora número 1 de Alfenas *et al.* (1991), modificada pela ausência de 2-Mercaptoetanol, demonstrada na Tabela 17. O processo de maceração foi efetuado com bastão de vidro, sobre placa de acrílico resfriada.

Fragmentos de papel filtro (Whatman nº 3) com dimensões de 6 x 10 mm, foram utilizados para absorção dos extratos de cada amostra. Em seguida, os fragmentos de papel filtro foram inseridos no gel, lado a lado. Cada gel comportou 20 amostras, sendo que em suas extremidades foram adicionados fragmento de papel filtro embebidos em solução de azul de bromofenol à 0,1 %, para visualização da migração.

Tabela 17. Solução extratora número 1 de Alfenas *et al.* (1991), modificada pela ausência de 2-Mercaptoetanol. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Reagente	Quantidade em 100 ml
Fosfato de sódio bibásico (0,034 M)	0,6 g
Sacarose (0,2 M)	7,0 g
PVP-40 (2,56 %)	2,56 g
DTT (3 mM)	50,0 mg
L- Ácido ascórbico (5,7 mM)	100,0 mg
DIECA (5,8 mM)	100,0 mg
Bissulfato de sódio (2,6 mM)	50,0 mg
Borato de sódio (Bórax) (2,5 mM)	50,0 mg
Polietilenoglicol-6000 (1 %)	1,0 g
Água destilada deionizada	100 ml

Tampão de Eletrodo e Gel

Utilizou-se como meio suporte para a eletroforese, gel de amido de milho (penetrose 30), à 13 %. Como tampão para eletrodo e gel foi utilizado uma solução Citrato Morfolina (CM): ácido cítrico – 8,4 g/l pH 6,1 titulado com N-(3-aminopropil) morfolina. Para o preparo do gel, o tampão foi diluído em 1:20.

Os géis foram mantidos, durante a migração, sob placa de gelo à temperatura de 5 °C em geladeira. Nos primeiros 20 minutos, empregou-se corrente constante de 20 mA com voltagem de 100 a 150 volts, passando para 300 a 350 volts após o aumento da corrente para 40 mA. Passados 20 minutos do início da migração, os fragmentos de papel filtro, contendo as amostras, foram retirados dos gel. O tempo de corrida foi de aproximadamente 6 horas, quando o marcador azul de bromofenol atingiu cerca de 6 cm. Após a migração, os géis foram cortados horizontalmente em seis fatias de aproximadamente 1,5 mm de espessura, utilizando-se as quatro fatias internas para colorimetria.

Sistemas Enzimáticos

Testes preliminares com alguns sistemas enzimáticos (ACP – Fosfatase ácida, EC. 3.1.3.2; G6PDH – Glucose-6-fosfato desidrogenase, EC. 1.1.1.49; MDH - Malato Desidrogenase, EC. 1.1.1.37; 6PGDH – 6 Fosfogluconato desidrogenase, EC. 1.1.1.44; PGI - Fosfogluose Isomerase, EC. 5.3.1.9; PGM – Fosfoglucomutase, EC. 2.7.5.1; PRX – Peroxidase, EC. 1.11.1.7; SKDH – Xiquimato desidrogenase, EC. 1.1.1.25) indicaram boa resolução para PGI, PGM, PRX e MDH. Assim, foram empregados estes quatro sistemas enzimáticos.

As fatias de gel foram embebidas em soluções contendo componentes necessários à coloração de uma enzima específica: tampão de coloração, substrato, catalisador, cofator e enzima, conforme a recomendação de Alfenas *et al.* (1991). As primeira, segunda, terceira e quarta fatias do gel, correspondem respectivamente aos sistemas enzimáticos PGI, PGM, PRX e MDH. A revelação ocorreu sob temperatura de 37 °C em estufa, dentro de 30 minutos a 2 horas.

Após a revelação das isoenzimas, efetuou-se a leitura dos zimogramas desenhando-se bandas em filme plástico e fotografando as fatias de gel com os zimogramas revelados. As interpretações genéticas foram realizadas pela segregação independente aparente, considerando a estrutura quaternária das enzimas.

Caracterização da variação genética

A partir da interpretação genética dos zimogramas, efetuaram-se as estimativas das frequências alélicas e dos índices de diversidade (heterozigosidade, porcentagem de locos polimórficos e número médio de alelos por loco) que foram utilizadas na caracterização da variação genética.

As frequências alélicas foram obtidas por: $p_i = n_i / n$, onde p_i = frequência do alelo i na população, n_i = número de ocorrências do alelo i na população e n = número total de alelos amostrados na população.

Foram feitas estimativas da porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por loco (A), das heterozigosidades médias observadas (H_o) e esperada (H_e) e do

índice de fixação (F). As estimativas das freqüências alélicas, P, A, Ho e He foram obtidas através do programa Biosys-1 (Swofford & Selander, 1989).

Para a estimativa da porcentagem de locos polimórficos, foram considerados o número de locos que apresentavam o alelo mais freqüente com ocorrência inferior a 95 %, em relação ao número total de locos. O número médio de alelos por loco foi estimado a partir da média aritmética do número de alelos de cada loco, efetuando-se a média aritmética entre locos. Para obtenção da heterozigosidade média observada, efetuou-se a média aritmética das proporções do número total de heterozigotos em relação ao número total de indivíduos entre os locos analisados. A heterozigosidade esperada (He) foi obtida por:

$He = 2n (1 - \sum p_i^2) / (2n - 1)$ (Nei, 1978), onde n = número de indivíduos amostrados, fazendo-se a média aritmética entre os locos estudados.

O índice de fixação foram estimados como desvios da heterozigosidade esperada, assim: $F = (Ho - He) / He$.

7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema PRX apresentou três regiões de atividade. O primeiro loco mostrou-se monomórfico. No segundo loco, dois alelos foram observados e, no terceiro loco constaram-se três alelos. O sistema PGM revelou dois locos polimórficos, o primeiro com três e o segundo com dois alelos. No sistema PGI constatou-se a presença de um loco com dois alelos. No sistema MDH foram encontrados quatro locos: o primeiro com três alelos, o segundo mostrou-se monomórfico, o terceiro apresentou dois alelos e no quarto loco constatou-se a presença de quatro alelos. A Figura 6 demonstra os zimogramas, em gel, dos quatro sistemas enzimáticos empregados na caracterização genética de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

As freqüências alélicas e o número de indivíduos analisados em cada loco estão demonstrados na Tabela 18.

Observou-se a ocorrência de 70 % de polimorfismo nos 10 locos analisados, sendo o loco considerado polimórfico se a freqüência do alelo mais comum não é superior a 0,95. Utilizando-se, no entanto, como critério uma freqüência de 0,99 para o alelo mais comum, 80 % dos locos são considerados polimórficos. Foram observados um número médio de 2,3

alelos por loco. Os valores de heterozigosidade média observada e esperada foram, respectivamente, 0,234 e 0,226. O índice de fixação encontrado foi de $-0,053$, revelando um excesso de heterozigotos. Os índices de diversidade são apresentados na Tabela 19.

O excesso de heterozigotos pode estar associado ao efeito de seleção natural a favor dos mesmos, como ocorre em indivíduos adultos de *Euterpe edulis* comparativamente às progênes (Reis, 1996). O excesso de heterozigotos tem sido descrito também para outras espécies tropicais como *Pithecellobium pedicelare* (O'Malley & Bawa, 1987), *Ceiba pentandra* (Murawski & Hamrick, 1992) e *Cecropia obtusifolia* (Alvarez-Buylla & Garay, 1994).

Em populações naturais de outras bromeliáceas os valores de H_e foram inferiores. Em *Aechmea magdalena* 24,1% dos locos apresentaram-se polimórficos (média de nove populações), com 1,16 alelos por loco, em média, e heterozigosidade esperada de 0,084 (Murawski & Hamrick, 1990). Populações de *Tillandsia ionantha* apresentaram porcentagem média de locos polimórficos de 16,7% e heterozigosidade esperada de 0,069 (Soltis *et al.*, 1987). Em *Tillandsia recurvata* constatou-se a presença de 3,7% de locos polimórficos em média de sete populações e heterozigosidade esperada de 0,010 (Soltis *et al.*, 1987).

A média de locos polimórficos reportados para monocotiledôneas é de 40,3%, para herbáceas perenes é de 30,3% e para plantas tropicais é de 32,7% (Hamrick & Godt, 1989). Em resultados publicados por Hamrick *et al.* (1979), espécies de polinização aberta apresentam 51,07% de locos polimórficos e 0,185 de heterozigosidade esperada. Em média, 50% dos locos em espécies vegetais são polimórficos e a diversidade genética é de 15%. Dentro de uma população estes valores são reduzidos para, respectivamente, 34% e 11%. Considerando os valores médios para várias espécies obtidos por Hamrick e Godt (1989) e os resultados obtidos para outras espécies de bromélias (Murawski & Hamrick, 1990; Soltis *et al.*, 1987), pode-se inferir que a população analisada de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* apresenta uma elevada diversidade genética. Esta alta diversidade se deve possivelmente ao fato de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* ser uma espécie de polinização cruzada (Reitz, 1983), processo que favorece o aumento de heterozigosidade dentro das populações naturais (Loveless & Hamrick, 1984). A polinização cruzada ocorre na maioria das bromeliáceas, pois as flores são protândricas (Reitz, 1983). Aliado à isto, pode haver

um processo seletivo em favor dos heterozigotos, como ocorre em populações naturais de *Euterpe edulis* (Reis, 1996).

Os conceitos de conservação e manejo sustentável implicam em manutenção da variabilidade genética e exploração controlada de populações naturais, dando continuidade ao ciclo evolutivo da população, através da reposição de propágulos (Reis, 1996). A preocupação dirige-se aos indivíduos que permanecem na população, para a manutenção dos níveis de diversidade originais a fim de manter-se o dinamismo populacional. Segundo o autor, a sustentabilidade dos processos depende de como ficam as populações após a exploração, pois são os indivíduos não retirados que farão a recomposição dos estoques originais ou reestruturação demográfica após o processo exploratório. O dinamismo populacional é assegurado com a perspectiva de cruzamento e recombinações ou a permanência de genótipos pré-existentes (quando predomina a autogamia), permitindo adaptações ao ecossistema (Reis, 1996).

Considerando os valores elevados de variação genética e os índices de fixação baixos ou negativos obtidos em *Astrocarium mexicanum*, Eguiarte *et al.* (1992) sugerem que a depressão endogâmica possa ser um importante fator no processo evolutivo da maioria das espécies tropicais. Deste modo, a autofecundação, endogamia ou populações pequenas devem ser evitadas em estratégias para o manejo e conservação de populações naturais. Além disso a manutenção dos elevados níveis de heterozigosidade também favorece a manutenção da dinâmica populacional, levando à uma população de adultos com maior diversidade, a qual poderá gerar novas progênes com características desejáveis de variabilidade (Reis, 1996).

O manejo e conservação de uma população de bromeliáceas caracterizada pela alta frequência de heterozigotos, deve ter como base a manutenção desta variabilidade, explorando-se apenas os indivíduos clonados, obtidos por propagação vegetativa, que ocorrem em colônias sendo produzidos por brotações laterais, e mantendo-se os indivíduos em fase reprodutiva destas colônias. Uma vez que sejam explorados apenas os indivíduos clonados, não altera-se a composição genotípica da população, e a manutenção dos indivíduos em fase reprodutiva dentro da população contribui para o surgimento constante de recombinações gênicas, mantendo-se a diversidade e a dinâmica da população.

Tabela 18. Frequências alélicas para dez locos alozímicos em uma população natural de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, procedente de dunas da praia do Campeche, em Florianópolis, SC. LFDGV/CCA/UFSC. 2000.

Loco	Alelo	Frequências Alélicas
PRX 1	N*	52
	1	1,0
PRX 2	N	51
	1	0,912
	2	0,088
PRX 3	N	60
	1	0,942
	2	0,050
	3	0,008
PGM 1	N	35
	1	0,871
	2	0,114
	3	0,014
PGM 2	N	22
	1	0,659
	2	0,341
PGI 1	N	59
	1	0,788
	2	0,212
MDH 1	N	26
	1	0,808
	2	0,154
	3	0,038
MDH 2	N	31
	1	1,0
MDH 3	N	30
	1	0,967
	2	0,033
MDH 4	N	29
	1	0,569
	2	0,345
	3	0,034
	4	0,052

* - N = número de indivíduos analisados.

Tabela 19. Índices de diversidade genética, porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade média observada (Ho) e esperada (He) e índice de fixação (F) em uma população natural de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, procedente de dunas da praia do Campeche, em Florianópolis, SC. LFDGV/CCA/UFSC. 2000.

P (%)	A	Ho	He	F
70	2,3	0,234	0,226	- 0,0353

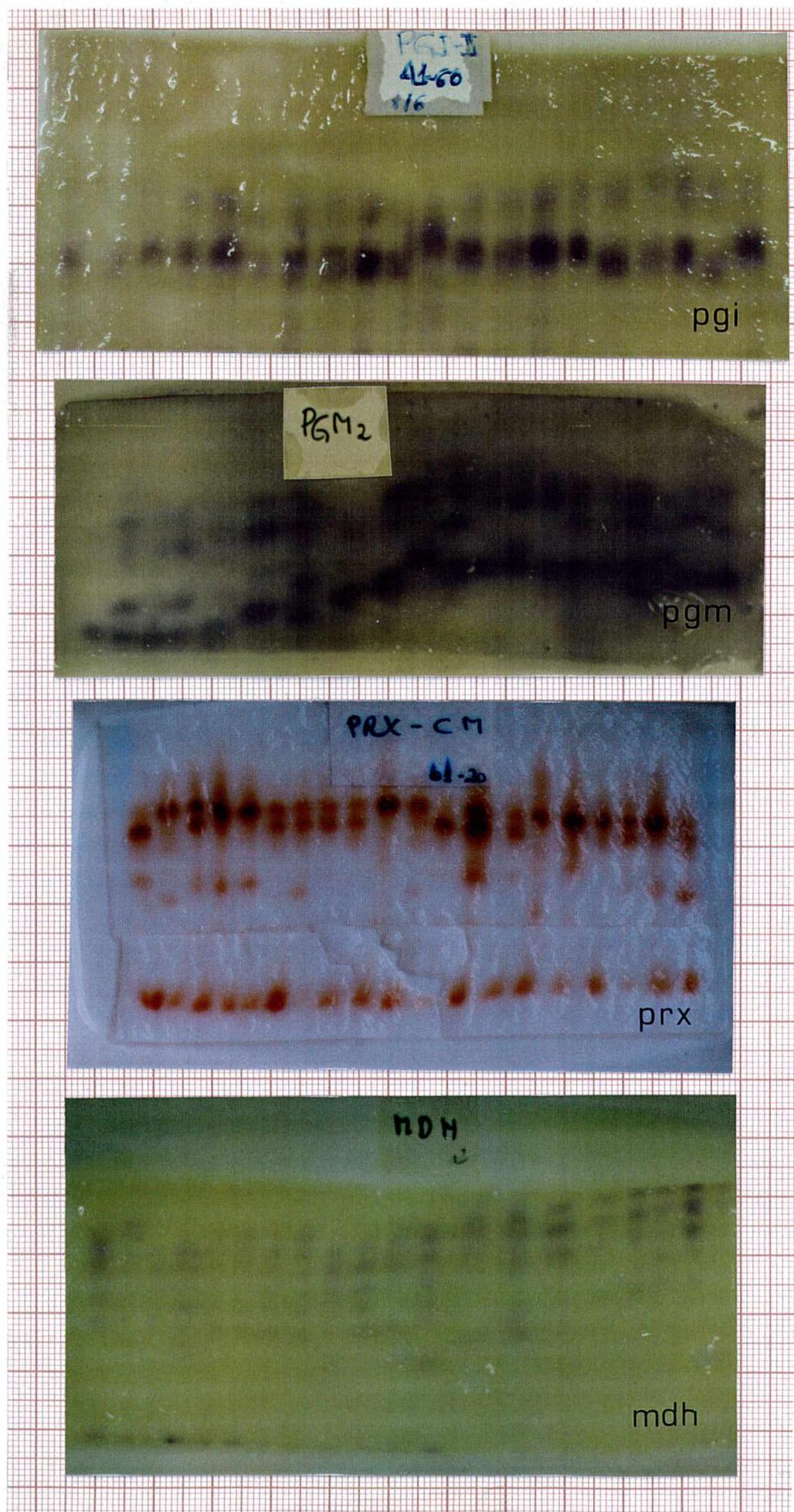


Figura 6. Zimogramas, ainda em gel, para os quatro sistemas enzimáticos (PGI – Fosfoglucoase isomerase; PGM – Fosfoglucomutase; PRX – Peroxidase; MDH – Malato desidrogenase) em pregados em *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, procedente de dunas da praia do Campeche, em Florianópolis, SC. LFDGV/CCA/UFSC. 2000.

8. SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- 1) O meio de cultura basal semi-sólido MS suplementado com 2,4-D (20,0 μM) e KIN (1,0 μM) promoveu a proliferação de massas celulares em 90,62% dos explantes foliares de brotos de *Vriesea reitzii*. Essas massas celulares diferenciaram-se em gemas, que, contudo, não foram convertidas em brotos.
- 2) O sistema de imersão temporária mostrou-se pouco eficiente para a micropropagação de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, considerando-se os resultados obtidos no cultivo de outras espécies, sendo que o melhor tratamento, ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM), promoveu uma taxa média de proliferação de brotos de 16,66. No sistema convencional, os tratamentos com PBZ em sua composição promoveram as maiores taxas de proliferação: 20,10 gemas para o tratamento ANA (2,0 μM), BAP (4,0 μM) e PBZ (3,0 μM) e 26,11 para o tratamento PBZ (3,0 μM).
- 3) Microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* surgidas espontaneamente em brotos multiplicadas em meio de cultura basal líquido suplementado com ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM), quando submetidas aos meios de cultura suplementados, ou não, com os fitoreguladores 2,4-D, ANA, BAP, KIN e 2IP, para a multiplicação, e diferentes concentrações de AG_3 para crescimento, apresentaram diferenças estatísticas em seus resultados, sendo que os melhores tratamentos (Tabela 16) promoveram o desenvolvimento de, no mínimo, 170 brotos por grama de inóculo (microgemas).
- 4) Na caracterização genética da população de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, por eletroforese de isoenzimas, observou-se a ocorrência de 70% de polimorfismo nos 10 locos analisados. Detectou-se um número médio de 2,3 alelos por loco. Os valores de heterozigosidade média observada e esperada foram, respectivamente, 0,234 e 0,226. O índice de fixação encontrado foi de $-0,053$, revelando um excesso de heterozigotos.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram o potencial de emprego das técnicas de cultura de tecidos vegetais para a propagação massal e a conservação de bromélias da Mata Atlântica. Os impactos destes resultados podem ser resumidos sob dois prismas fundamentais: o emprego de sementes como explantes poderá permitir a propagação massal e a conseqüente manutenção da diversidade genética observada nas populações naturais. Neste caso, o impacto destas técnicas estará mais relacionado com a conservação de germoplasma. Por outro lado, o emprego de explantes originados de estruturas vegetativas como gemas e bases foliares poderá permitir a propagação clonal massal de um genótipo selecionado, com potencial considerável de aplicação para a clonagem com propósitos ornamentais. No presente trabalho, as sementes foram os explantes iniciais de todos os experimentos, dando origem à brotos que após a sua multiplicação foram utilizadas como explantes diretos para a realização dos ensaios. Desta forma, efetuou-se simultaneamente a manutenção da diversidade e a clonagem desses genótipos.

A multiplicação de brotos a partir de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, revelou a possibilidade de obter-se elevadas taxas de proliferação na propagação de bromeliáceas, podendo equivaler à taxas obtidas em processos embriogênicos. Contudo, os experimentos foram delineados em caráter exploratório e, portanto, são necessários estudos complementares visando: a) a elucidação das rotas morfogênicas relacionadas com a obtenção das microgemas; b) a otimização das técnicas de imersão temporária e estacionária; c) a indução morfogênica a partir de bases foliares; d) a determinação mais precisa da origem das microgemas e calos de bases foliares por meio de estudos histológicos e dos níveis hormonais endógenos que possam ter influência sobre este processo morfogênico.

A população natural de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* caracterizada geneticamente, através de marcadores alozímicos, revelou possuir uma elevada diversidade genética, o que leva à possibilidade de inserir-se em programas de manejo e conservação de germoplasma. O estudo realizado para esta espécie poderá servir de base para estudos mais aprofundados com estas e outras bromeliáceas da Mata Atlântica.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN – CHRISTIE, J. 1991. Automation. In: P. C., Debergh, R. H., Zimmerman (eds.). *Micropropagation: Technology and Application*. 363-388. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W; PASSADOR. G.C. 1991. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Universidade Federal de Viçosa. MG.
- ALLARD, R.W. 1975. The mating system and microevolution. *Genetics*, 79: 115-26.
- ALVARD, F. C. & TEISSON, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55-60.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R. & GAREY, A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer species. *Evolution*, 48(2): 437-53.
- ALVES, G.M. & GUERRA, M.P. 1995. Regeneração *in vitro* de espécies de bromélias da floresta atlântica. In: *Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*. Lavras, 5.1995, Lavras, MG. Anais...453p. p. 182.
- ALVES, G.M. & GUERRA, M.P. 1996. Conservação e propagação massal *in vitro* de germoplasma de bromeliáceas. In: *Reunião Especial da SBPC: Ecossistemas Costeiros, Do conhecimento à gestão*. Florianópolis, 3. 1996, Florianópolis, SC. Anais... 586p. p. 431.
- AMMIRATO, P.V. 1983. Embryogenesis. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. MacMillan Publishing, New York. 1: 82-123.
- BAKER, E. A. 1974. The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. *New Phytol.*, 73: 955-66.
- BENZING, D. H. 1970. Availability of exogenously supplied nitrogen to seedlings of the Bromeliaceae. *Bull Torrey Bot. Club*. 97: 154-59.
- BENZING, D. H. 1973. Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae. *Quat. Review Biol.* 48: 277-290.
- BENZING, D. H. 1974. The mineral nutrition of Bromeliaceae. *Bot. Gaz.* 135:281-288.
- BENZING, D. H. 1978. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. *Am. J.Bot.* 65:359-365.
- BENZING, D. H. 1987. Vascular epiphytism: Taxonomic participation and adaptive diversity. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 74:183-204.
- BENZING, D. H. 1990. Vascular epiphytes, general biology and related biota. Ashton, P.S.(ed.), Cambridge University Press, 354p.
- BENZING, D. H. & PRIDGEON, A. 1983. Foliar trichomes of Peerothallidine: functional significance. *Am.J.Bot.* 70:173-180.

- BORDOLOI, N.D. & SARMA, C.M. 1993. In vitro callus induction and plantlet regeneration of pineapple. *Journal of the Assam Science Society*. 35(1): 41-45.
- BRAMWELL, D. 1990. The role of in vitro cultivation in the conservation of endangered species. In: bermejo, J.E.H., Clemente, M., Heywood, V. (eds.). Conservation techniques in botanic gardens. Koenigstein: Koeltz Scientific Books. p. 3-15.
- CAMPOSTRINI, E. & OTONI, W. C. 1996. Aclimação de plantas: abordagens recentes. *ABCTP Notícias*. p.2-12.
- CARNEIRO, L.A.; CÂNDIDO, M.S.D.; ARAUJO, R.F.G.; FONSECA, M.H.P.B.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. 1998 a. Clonal proapagation of *Cryptanthus sinuosos* L.B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. *Plant tissue culture and biotechnology* 4 (3-4): 153-58.
- CARNEIRO, L.A.; ARAUJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. 1998 b. In vitro regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, na endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 00: 1-5.
- CISNEROS, A.; M. DAQUINTA; Y. RODRIGUES; M. ESCALONA; I. LUNA; C. BORROTO. 1996. Influencia de los reguladores del crecimiento clorinados en la embriogénesis somática en piña. *Rev.bras.Frutic. Cruz das Almas, v.18,n.2.p.269-274.*
- DAQUINTA, M.; ALMEIDA, A.P.; GUERRA, M.P. 1998. In vitro morphogenesis of immature flower and buds of flower stalk in *Dyckia distachya*. *Journal of the bromeliad society*, 49 (2):72-76.
- DAQUINTA, M.; ESPINOSA, P.; ESCALONA, M.; RODRÍGUEZ, R.; GUERRA, M.P.1999. Bromeliads micropropagation in temporary immersion system. *BioVeg'99*, p. 23.
- DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal Experimental of Botany*. 48(313): 1493-1509.
- DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E.; LEE, K. Y. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 4: 43-50.
- EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, N.; PIÑERO, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocarium mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; FLICK, C.E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.). *Tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, New York. P.45-113.
- FAY, M.F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28: 1-4.
- FIM, R.D. 1986. Growth substance sensitivity: The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. *Physiol. Plant.* 67: 267-272.

- FITCHET-PURNELL, M.; D.P. BARTHOLOMEW; K.G. ROHRBACH. 1993. Maximum utilization of pineapple crowns for micropropagation. *Acta Horticulturae*. 334: 325-330.
- GEORGE, E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. The Technology. 2 ed., Edington: Exegetics, 547 p.
- GRAEBE, J. E. 1987. Gibberellin biosynthesis and control. *Ann. Rev. Plant Pphysiol*. 38: 419-65.
- GUERRA, M.P. & HANDRO, W. 1991. Somatic embryogenesis in tissue culture, of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). In: Ahuja, R. (ed.). *Wood Plant Biotechnology*. New York: Plenum Press 189-196.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999. a. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). *Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB. pp. 533-568. V.2.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. 1999. b. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília, 34 (9):1557-63.
- HABERLANDT, G. 1902. Cultuversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. (Wien) 111 (1): 69-92.
- HANRICK, J.L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J.B. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev.Ecol. Syst.* 10: 173-200.
- HAMRICK, J.L. & GODT, M. J. W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H. D., Clegg, M.T., Kahler, A. L., Weir, B. S (eds.). *Population genetics and germplasm resources in crop improvement*. 44-64. Sinauer, Sunderland, MA.
- HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D. 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. *Biotropica* 18: 201-207.
- HEYWOOD, V.H. & BASTE, I. 1995. Introduction. In: *Global Biodiversity Assessment* (Heywood, V.H., ed.). UNEP/ Cambridge University Press, New York, pp. 1-20.
- HEYWOOD, V.H. 1995. (ed.). *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge. UNEP/Cambridge University Press. 1995. 1140p.
- HOSOKI, T. & ASAHIRA, T. 1980. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. *HortScience*. 15: 603-04.
- JACOBSEN, H.J. & DOHMEN, G. 1990. Modern plant biotechnology as a tool for the reestablishment of genetic variability in *Sophora toromiro*. *Cour. Forschungs Inst. Sencken.* 125: 233-37.
- JONES, J. B. & MURASHIGE, T. 1974. Tissue propagation of *Aechmea fasciata* and others bromeliads. *Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 24: 117-126.

- KEVERS, C.; GOLDBERG, R.; CHU-BA, J.; GASPAR, T. H. 1988. Composition of the walls of stem and leaves of vitrifying carnation. *Biol. Plant.*, 30: 219-33.
- KISS, E.; J. KISS; G. GYULAI; L.E. HESZKY. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience*, 30(1): 127-129.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *Am. Orchid Soc. Bull.* 15: 214-17.
- LEME, E.M.C. 1984. Bromélias. *Ciência Hoje*. 3 (14): 66-72.
- LITZ, R.E. & JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura – Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 970p.
- LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- MAPES, M. O. 1973. Tissue culture of bromeliads. *Combined Proc. In Plant Propagators Soc.* 23: 47-55.
- McCOWN, B.H.; ZELDIN, E.L.; PINKALLA, H.; DEDOLPH, R.R. 1988. Nodule culture: a developmental pathway with high potential for regeneration, automated micropropagation, and plant metabolite production from woody plants. In: Hanover, J.W., Keathley, D.E. (eds.). *Genetic manipulation of wood plants*. Plenum Press, New York, p. 149-66.
- MEKERS, O. 1977. In vitro propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Acta Horticulturae*. 78: 311-17.
- MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. 1992. In vitro multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30: 247-249.
- MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. 1993. Micropropagation of *Dyckia macedoi* - an endangered endemic Brazilian bromeliad. *Botanic Gardens Micropropagation News*. 1(6): 70-72.
- MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. 1997. Micropropagation of Ornamental Bromeliads (Bromeliaceae). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 40: 43-57.
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.; VON SALTZA, M.H.; STRONG, F.M. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1392.
- MOREL, G.M. & WETMORE, R.H. 1951. Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.* 38: 141-143.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473 - 497.
- MURAWSKI, D.A. & HAMRICK, J.L. 1990. Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalena*. *Amer. J. Bot.*, 77(9): 1201-8.

- MURAWSKI, D.A. & HANRICK, J.L. 1992. Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Panamá. *Journal of Heredity*, 83: 401-4.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-90.
- NOBENCOURT, P. 1939. Sur le radicules naissant des cultures de tissus vegetaux. *C. R. S. Soc. Biol.* 130:1271.
- O'MALLEY, D.M. & BAWA, K.S. 1987. Mating system of a tropical rain forest tree species. *Amer. J. Bot.*, 74 (8): 1143-9.
- PADILHA, V. 1978. *Bromeliads*: New York, Crow Publishers Inc, 134p.
- PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H. H. M.; HENDRIKS, J. 1984. The influence of naphthaleacetic acid on the growth of in vitro-cultivated seedlings of Bromeliaceae. *Sci Hort.* 24: 193-199.
- PINOTTI, M.; RACHOU, R.G.; FERREIRA, M.O. 1947. Alguns aspectos epidemiológicos da malária do litoral sul do Brasil, em zona de transmissão por anofelinos do sul – gênero *Kerteszia*. Publicação do M.S.E. – Serviço Nacional da Malária, D.N.S.
- REINERT, J. 1958. Untersuchungen über die morphogenese und gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71:15.
- REINERT, J.; BACKS-HUSEMANN, D.; ZERBAN, H. 1971. Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. *Coll. Natl. C.N.R.S. (Paris)*: 261-68.
- REIS, M.S. 1996. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. *Revista Brasileira de Genética*, 19(4):37-47.
- REITZ, R. 1983. Bromeliáceas e a malária-Bromélia endêmica, *Flora ilustrada Catarinense*.
- REITZ, R. 1985. Bromélias, *Ciência Hoje*, 21 (4): 51-57.
- ROBERTS, A. V.; WALKER, S.; HORAN, I.; SMITH, E. F; MOTTLEY, J. 1992. The effects of growth retardants, humidity and lighting at stage III on stage IV of micropropagation in chrysanthemum and rose. *Acta Horticulturae*. 319: 153-57.
- ROBERTS, A. V. & MATTHEWS. 1995. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. 5. The 2S, 3S enantiomer of paclobutrazol improves resistance to desiccation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Kluwer Academic Publishers. 40: 191-93.
- SASS, I.E. 1951. Botanical microtechnique. IOWA, The Iowa State Coll. Preh.
- SHARMA, K.K. & THORPE, T.A. 1995. Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. In: Thorpe, T.A. (ed.). *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p. 17-72.
- SKOOG, F. 1944. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Amer. J. Bot.* 31:19-244.
- SKOOG, F. & MILER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-30.

- SKOOG, F. & TSUI, C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-130.
- SIMITH, L.B. & DOWNS, R.J. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14 (2):621-1492.
- SMITH, E. F.; ROBERTS, A. V.; MOTTLEY, J. 1990. The preparation in vitro of chrysanthemum for transplantation to soil. 2. Improved resistance to desiccation conferred by paclobutrazol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 27:133-40.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. 1995. *Biometry*. 3rd ed. New York, W.H. Freeman and Co. 881 p.
- SOLTIS, D. E.; GILMARTIN, A. J.; RIESEBERG, L.; GARDNER, S. 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recuvarta* (Bromeliaceae). *Amer. J. Bot.* 74 (4): 531-37.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells; 2: Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45:705-708.
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B. 1989. *A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics*. Release 1.7. Natural History Survey, Illinois. 43 p.
- TEISSON, C. & ALVARD, D. 1995. A new concept of plant in vitro culture in liquid medium: temporary immersion. *VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. IAPTC, Firenze, June, 12-17.
- TENG, W.L. 1997. An alternative propagation method of *Ananas comosus* through nodule culture. *Plant Cell Report* 16: 454-57.
- THORPE, T.A. 1980. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. In: Vasil, I.K. (ed.). *Perspectives in plant cell and tissue culture*. Academic Press, New York. p. 71-111.
- THORPE, T.A. 1983. Morphogenesis and regeneration in tissue culture. In: Owens, L.D. (ed.). *Genetic engineering: Applications to agriculture*. Rowman and Allanhead, Totowa, New Jersey, p. 285-303.
- THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. 1991. Application of micropropagation to forestry. In: P.C. Debergh; R.H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation – technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p. 311-336.
- TISSERAT, B.; ESAN, E.B.; MURASHIGE, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1: 18-78.
- TOMBOLATO, A.F.C.; S.S.G. TAKEBAYASHI; A.M.M. COSTA; E.A. QUIRINO. 1991. In vitro culture of bromeliads. *Agronomico*: 43: 2-3, 77-78.

- VAN DER LINDE, P.C.G. 1990. Hormone action and sensitivity: possible relation to aging. In: Rodrigues, R., Sanches, M., Tames, R., Durzan, D.J. (eds). *Plant Aging: Basic na Applied Approaches*. New York: Plenum Press, p. 285-292.
- VILLALOBOS, V.M. & THORPE, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura – Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 970p.
- VINTERHALTER, B. & VINTERHALTER D. 1994. True-to-the type in vitro propagation of *Aechmea fasciata* Baker. *Scientia Horticulturae*. 57(3): 253-263.
- WHITE, p.r. 1939. Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club*. 66:507-513.
- WILLIAMS, E.S. & MAHESWARAN, B. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as na embryogenic group. *Ann. Botany*, 57: 443-462.
- YEUNG, E.C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.). *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p. 205-247.
- ZIMMER, K. & PIEPER, W. 1976. Methods and problems of clonal propagation of bromeliads *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 64: 25-29.
- ZIV, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: P. C., Debergh, R. H., Zimmerman (eds.). *Micropropagation: Technology and Application*. 45-69. London, Kluwer Academic Publishers.
- ZIV, M. 1995. *In vitro* acclimatization. In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M. L. A. (eds.). *Automation and Enviromental Control in Plant Tissue Culture*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 493-516.
- ZORNIG, R.K. 1996. Micropropagação de bromélias. *Bromélia* 3 (3): 3-9.

11. ANEXO I – RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA

Tabela 1. Resumo da análise de variância para a percentagem média de bases foliares de *Vriesea reitzii* com indução de calos embriogênicos, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de 2,4-D e KIN (1,0 μ M), em meio de cultura semi-sólido basal, 60 dias após a inoculação. Dados transformados ($\log(x+2)$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	3	0,034 *
Resíduo	28	0,003
Total	31	
CV (%)		14,04

*P<0,05

Tabela 2. Resumo da análise de variância para a taxa de proliferação de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes combinações de ANA, BAP e PBZ (μ Mol) adicionados ao meio de cultura bsal, 90 dias após a inoculação. Dados transformados ($\log(x+2)$).LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	3	0,787 *
Resíduo	36	0,013
Total	39	
CV (%)		10,18

* P<0,05

Tabela 3. Resumo da análise de variância para diâmetro e altura (mm) de gemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes combinações de ANA, BAP e PBZ (μ Mol) adicionados ao meio de cultura bsal, 90 dias após a inoculação. Dados transformados ($\log(x+2)$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM Diâmetro (mm)	QM Altura (mm)
Tratamentos	3	0,027 *	0,154 *
Resíduo	36	0,004	0,016
Total	39		
CV (%)		10,90	9,95

* P<0,05

Tabela 4. Resumo da análise de variância para o número de aglomerados totais de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em sistema de imersão temporária, em resposta à diferentes combinações de ANA, BAP e PBZ (μMol) adicionados ao meio de cultura MS, 90 dias após a inoculação. Dados transformados ($\log(x+2)$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM
Tratamento	3	0,212 *
Bloco	3	0,002 ^{ns}
Resíduo	9	0,036
Total	15	
CV (%)		19,16

* $P < 0,05$, ns = não significativo

Tabela 5. Análise Kruskal-Wallis para taxa de proliferação de brotos por aglomerado inicial de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em sistema de imersão temporária, em resposta à diferentes combinações de ANA, BAP e PBZ (μMol) adicionados ao meio de cultura MS, 90 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

TRATAMENTO	TAMANHO DA AMOSTRA	MÉDIA
MS ₀	4	8,75
A ₂ B ₄	4	13,0
A ₂ B ₄ P ₃	4	9,0
P ₃	4	3,25

Teste estatístico = 8,49 Nível de significância = 0,036

Tabela 6. Resumo da análise de variância para peso médio (g) de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes tratamentos: meio de cultura basal; ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM); AG₃ (6,0 μM) e 2,4-D (5,0 μM) e KIN (1,0 μM), em meio de cultura semi-sólido basal, 60 dias após a inoculação. Dados transformados ($\log(x+2)$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	3	0,590 *
Resíduo	116	0,007
Total	119	
CV (%)		16,42

* $P < 0,05$

Tabela 7. Resumo da análise de variância para percentagem média de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* com gênese celular, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações 2,4-D e KIN (1,0 μ M), em meio de cultura semi-sólido MS, 60 dias após a inoculação. Dados transformados (raiz $(x+0,5)$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	3	0,078 *
Resíduo	76	0,024
Total	79	
CV (%)		13,58

*P < 0,05

Tabela 8. Resumo da análise de variância para o peso médio (g) de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal isento de fito reguladores, ou suplementado com ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), e AG₃ (6,0 μ M), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes tratamentos: 2IP (12,0 μ M), KIN(12,0 μ M), BAP(12,0 μ M), ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), ANA(12,0 μ M), adicionados, ou não, ao meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Dados transformados (log $(x+2)$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM
Tratamento	5	0,063 ns
Origem	2	0,159 *
Interação Tratamento-Origem	10	0,025 ns
Resíduo	162	0,025
Total	179	
CV (%)		25,99

*P < 0,05

Tabela 9. Resumo da análise da variância para o peso médio (g) de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal semi-sólido, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μ M, em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Dados transformados (raiz $(x+0,5)$). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	3	0,837 *
Resíduo	116	0,021
Total	119	
CV (%)		11,41

*P < 0,05

Tabela 10. Resumo da análise de variância para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal isento de fitoreguladores, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μM, em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Dados transformados: peso – (raiz x+0,5)); brotos e brotos/g – (logX). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM Peso (g)	QM N° total de brotos	QM Brotos/g
Tratamentos	3	0,200 *	0,278*	0,007ns
Resíduo	116	0,033	0,036	0,012
Total	119			
CV (%)		14,41	8,50	5,00

* P < 0,05, ns = não significativo

Tabela 11. Resumo da análise de variância para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura MS suplementado com o tratamento ANA (12,0 μM), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μM, em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Dados transformados: peso – (raiz x+0,5)); brotos e brotos/g – (logX). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM Peso (g)	QM N° total de brotos	QM Brotos/g
Tratamentos	3	0,017 ns	0,086 ns	0,060 ns
Resíduo	116	0,008	0,032	0,024
Total	119			
CV (%)		7,75	9,3	7,63

ns = não significativo

Tabela 12. Resumo da análise de variância para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento AG₃ (6,0 μM), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μMol em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Dados transformados: peso – (raiz x+0,5)); brotos e brotos/g – (logX). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM Peso (g)	QM N° total de brotos	QM Brotos/g
Tratamentos	3	0,011 ns	0,139 *	0,294 *
Resíduo	116	0,036	0,045	0,028
Total	119			
CV (%)		17,36	9,90	7,11

* P < 0,05, ns = não significativo

Tabela 13. Resumo da análise de variância para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento ANA (2,0 μM) e BAP (4,0 μM), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μM em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Dados transformados: peso – (raiz x+0,5)); brotos e brotos/g – (logX). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM Peso (g)	QM N° total de brotos	QM Brotos/g
Tratamentos	3	0,027 ns	0,138 *	0,054 *
Resíduo	116	0,020	0,029	0,010
Total	119			
CV (%)		11,37	7,52	4,49

* P < 0,05, ns = não significativo

Tabela 14. Resumo da análise de variância para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento KIN (12,0 μ M), cultivadas *in vitro*, frente à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μ Mol em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Dados transformados: peso – (raiz x+0,5)); brotos e brotos/g – (logX). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM Peso (g)	QM N° total de brotos	QM Brotos/g
Tratamentos	3	0,077 *	0,435 *	0,047 ns
Resíduo	116	0,016	0,074	0,023
Total	119			
CV (%)		12,71	13,80	6,55

* P < 0,05, ns = não significativo

Tabela 15. Resumo da análise de variância para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento 2iP (12,0 μ M), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μ Mol em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. Dados transformados: peso – (raiz x+0,5)); brotos e brotos/g – (logX). LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Causas de variação	GL	QM Peso (g)	QM N° total de brotos	QM Brotos/g
Tratamentos	3	0,054 *	0,121 *	0,031 *
Resíduo	116	0,014	0,019	0,008
Total	119			
CV (%)		10,47	6,62	4,11

* P < 0,05

12. ANEXO II – DADOS ORIGINAIS

Tabela 1. Dados originais para a percentagem média de bases foliares de *Vriesea reitzii* com gênese celular, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de 2,4-D e KIN (1,0 μ M), em meio de cultura semi-sólido basal *, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

2,4-D (0,0 μ M)	2,4-D (5,0 μ M)	2,4-D (10,0 μ M)	2,4-D (20,0 μ M)
50	100,00	87,50	100,00
0	87,50	100,00	75,00
0	87,50	87,50	87,50
0	62,50	87,50	100,00
0	87,50	0,00	87,50
0	62,50	0,00	100,00
0	50,00	0,00	87,50
0	0,00	0,00	87,50

*- MS (Murashige & Skoog, 1962)

Tabela 2. Dados originais para a taxa de proliferação de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes combinações de ANA, BAP e PBZ (μ M) adicionados ao meio de cultura basal, 90 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

ANA*	BAP*	PBZ*	ANA	BAP	PBZ	ANA	BAP	PBZ	ANA	BAP	PBZ
0,0	0,0	0,0	2,0	4,0	0,0	2,0	4,0	3,0	0,0	0,0	3,0
	4,67			11,67			22,33			24,33	
	4,33			13,00			16,67			16,67	
	5,00			10,33			21,67			33,00	
	10,00			11,67			20,33			24,67	
	6,00			9,33			20,00			21,33	
	7,67			8,67			20,00			49,00	
	4,67			11,67			16,67			29,33	
	4,33			11,00			21,67			15,33	
	9,33			8,33			20,00			32,67	
	5,33			15,67			21,67			15,33	

*- μ Mol

Tabela 3. Dados originais para o número de aglomerados totais de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em sistema de imersão temporária, em resposta à diferentes combinações de ANA, BAP e PBZ (μM) adicionados ao meio de cultura basal, 90 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

BLOCOS	ANA*	BAP*	PBZ*	ANA	BAP	PBZ	ANA	BAP	PBZ	ANA	BAP	PBZ
	0,0	0,0	0,0	2,0	4,0	0,0	2,0	4,0	3,0	0,0	0,0	3,0
B1	9			20			9			1		
B2	10			24			8			1		
B3	11			13			4			9		
B4	9			11			6			5		

*- μMol

Tabela 4. Dados originais para taxa de proliferação de brotos por aglomerado inicial de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* cultivadas *in vitro*, em sistema de imersão temporária, em resposta à diferentes combinações de ANA, BAP e PBZ (μM) adicionados ao meio de cultura basal, 90 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

BLOCOS	ANA*	BAP*	PBZ*	ANA	BAP	PBZ	ANA	BAP	PBZ	ANA	BAP	PBZ
	0,0	0,0	0,0	2,0	4,0	0,0	2,0	4,0	3,0	0,0	0,0	3,0
B1	27,20			71,80			57,00			0,60		
B2	32,20			71,60			54,60			1,20		
B3	19,40			29,00			11,80			19,60		
B4	23,20			27,60			13,40			7,60		

*- μMol

Tabela 5. Dados originais para peso médio (g) de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes tratamentos: ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M); AG₃ (6,0 μ M), e 2,4-D (5,0 μ M) e KIN (1,0 μ M), adicionados, ou não, ao meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

Meio de cultura isento de fitoreguladores	ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M)	AG ₃ (6,0 μ M)	2,4-D (5,0 μ M) e KIN (1,0 μ M)
1,26	2,20	1,04	0,08
1,41	3,17	0,96	0,07
3,98	2,18	0,91	0,12
2,54	1,73	0,91	0,11
1,43	3,58	1,18	0,09
2,70	2,00	1,28	0,12
1,97	1,72	0,49	0,18
2,33	1,73	0,60	0,11
1,52	3,06	0,33	0,10
1,34	1,31	0,36	0,15
3,35	4,90	0,73	0,11
4,67	3,81	2,34	0,16
2,08	1,50	2,59	0,12
3,29	2,36	3,36	0,11
4,61	3,81	4,31	0,12
3,76	1,12	1,92	0,14
2,07	1,00	3,62	0,19
3,37	3,62	1,80	0,08
1,67	2,23	1,52	0,09
1,48	0,86	1,72	0,13
1,68	3,11	1,23	0,19
1,88	2,39	2,17	0,24
2,71	1,95	0,76	0,13
1,65	1,86	1,69	0,16
3,66	1,06	1,44	0,12
2,62	2,29	1,47	0,21
2,05	1,85	1,54	0,15
1,34	1,93	0,93	0,17
2,84	1,29	1,62	0,11
1,47	1,83	3,11	0,23

Tabela 6. Resumo da análise de variância para percentagem média de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* com gênese celular, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de 2,4-D e KIN (1,0 μ M), em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

2,4-D (0,0 μ M)	2,4-D (5,0 μ M)	2,4-D (10,0 μ M)	2,4-D (20,0 μ M)
100,00	100,00	0,00	100,00
100,00	100,00	100,00	100,00
0,00	100,00	55,55	100,00
100,00	100,00	100,00	88,88
100,00	100,00	100,00	100,00
88,88	100,00	100,00	100,00
33,33	88,88	100,00	100,00
100,00	100,00	100,00	100,00
33,33	100,00	66,66	100,00
66,66	100,00	88,88	100,00
100,00	100,00	100,00	100,00
11,11	100,00	100,00	100,00
100,00	100,00	100,00	0,00
100,00	100,00	100,00	100,00
22,22	88,88	100,00	100,00
33,33	100,00	100,00	100,00
100,00	100,00	100,00	100,00
100,00	100,00	100,00	100,00
0,00	44,44	100,00	0,00
0,00	0,00	100,00	77,77

Tabela 7. Dados originais para o peso médio (g) de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal isento de fito reguladores, ou suplementado com ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), e AG₃ (6,0 μ M), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes tratamentos: 2IP (12,0 μ M), KIN(12,0 μ M), BAP(12,0 μ M), ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M), ANA(12,0 μ M), adicionados, ou não, ao meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

MS	MS	MS	B	B	B	A	A	A	AB	AB	AB	K	K	K	P	P	P
0,77	0,70	0,85	0,61	0,58	0,64	0,59	0,75	0,66	0,69	0,52	0,75	0,70	0,52	0,72	0,77	0,72	0,76
0,30	0,30	0,30	0,42	0,59	0,66	0,67	0,52	0,69	0,81	0,53	0,58	0,82	0,68	0,67	0,78	0,63	0,69
0,30	0,66	0,89	0,66	0,56	0,82	0,53	0,40	0,52	0,76	0,50	0,80	0,79	0,61	0,79	0,63	0,77	0,30
0,30	0,79	0,81	0,37	0,65	0,70	0,58	0,52	0,50	0,30	0,49	0,82	0,81	0,66	0,65	0,30	0,30	0,30
0,84	0,30	0,60	0,72	0,60	0,70	0,68	0,41	0,57	0,75	0,64	0,81	0,76	0,66	0,67	0,30	0,68	0,77
0,53	0,30	0,81	0,70	0,74	0,76	0,54	0,65	0,63	0,47	0,70	0,80	0,30	0,60	0,63	0,83	0,79	0,82
0,30	0,30	0,56	0,66	0,65	0,62	0,44	0,47	0,52	0,57	0,58	0,61	0,30	0,62	0,49	0,71	0,71	0,89
0,30	0,30	0,39	0,74	0,54	0,73	0,50	0,51	0,59	0,30	0,46	0,69	0,39	0,77	0,66	0,30	0,93	0,69
0,30	0,30	0,90	0,63	0,54	0,77	0,51	0,58	0,69	0,74	0,59	0,84	0,47	0,56	0,72	0,82	0,83	0,70
0,80	0,74	0,45	0,67	0,43	0,81	0,48	0,71	0,69	0,56	0,61	0,58	0,70	0,53	0,75	0,69	0,63	0,30
MS	AG ₃	AB															

A - ANA(12,0 μ M)

AB - ANA (2,0 μ M) e BAP (4,0 μ M)

AG₃- AG₃ (6,0 μ M)

B - BAP(12,0 μ M)

K - KIN(12,0 μ M)

MS – meio de cultura basal isento de fitoreguladores

P - 2IP (12,0 μ M)

Tabela 8. Dados originais para o peso médio (g) de brotos de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal semi-sólido, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µM, em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

AG ₃ (0,0µM)	AG ₃ (5,0µM)	AG ₃ (10,0µM)	AG ₃ (15,0µM)
2,18	1,16	1,46	0,85
1,35	1,59	1,03	0,84
2,12	1,55	1,55	1,53
1,35	1,54	0,80	0,51
1,83	1,28	1,20	0,52
0,95	1,34	0,15	0,22
2,49	1,23	1,50	0,75
3,58	1,08	1,31	0,76
2,49	1,19	0,89	0,93
1,66	1,09	0,66	1,05
1,76	0,98	0,86	0,59
1,30	1,32	0,42	0,76
1,84	1,39	0,95	0,45
1,34	0,67	1,26	0,70
1,02	1,53	0,60	0,19
1,30	1,32	0,58	0,53
1,88	0,54	1,22	0,64
1,47	1,31	0,74	0,46
1,24	0,76	1,18	0,63
1,38	0,85	0,60	0,52
2,00	1,25	0,91	0,67
1,15	1,45	1,26	0,98
2,31	0,83	0,76	0,68
2,46	0,65	0,96	0,59
2,16	1,31	1,13	0,44
1,30	1,14	0,59	0,99
2,13	1,31	1,10	0,84
1,20	1,37	1,52	0,36
1,59	1,15	1,41	1,29
1,35	0,93	1,22	0,60

Tabela 9. Dados originais para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal isento de fitoreguladores, cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μ M em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M
0,25	1,66	0,14	1,25	107,00	270,00	35,00	221,00	428,00	162,65	250,00	176,80
0,85	2,11	1,55	1,01	140,00	335,00	258,00	226,00	164,70	158,76	166,45	223,76
1,11	1,07	1,11	0,81	158,00	153,00	160,00	172,00	142,34	142,99	144,14	212,34
0,62	0,91	1,52	0,92	135,00	140,00	215,00	168,00	217,74	153,84	141,44	182,60
0,76	1,61	1,70	1,49	138,00	255,00	270,00	227,00	181,57	158,38	158,82	152,34
0,24	0,34	0,47	1,16	42,00	115,00	125,00	196,00	175,00	338,23	265,95	168,96
1,18	1,42	1,53	0,89	153,00	245,00	239,00	171,00	129,66	172,53	156,20	192,13
0,99	1,24	2,11	1,00	118,00	170,00	335,00	195,00	119,19	137,09	158,76	195,00
1,63	0,81	1,07	1,22	279,00	123,00	153,00	223,00	171,16	151,85	142,99	182,78
1,12	1,54	1,29	1,03	243,00	232,00	168,00	236,00	216,96	150,64	130,23	229,12
1,08	0,86	1,28	1,23	176,00	125,00	165,00	235,00	162,96	67,20	128,90	191,05
1,21	1,10	0,79	1,67	208,00	212,00	135,00	250,00	171,90	192,72	170,88	149,70
1,33	1,15	1,00	0,59	253,00	197,00	138,00	89,00	190,22	171,30	138,00	150,84
1,04	0,99	0,61	2,20	126,00	183,00	73,00	200,00	121,15	184,84	119,67	90,90
0,97	1,11	1,04	0,69	151,00	228,00	145,00	108,00	155,67	205,40	139,42	156,52
0,79	1,19	0,82	0,85	105,00	216,00	153,00	186,00	132,91	181,51	186,58	218,82
1,48	1,01	1,70	1,04	213,00	159,00	275,00	245,00	143,91	157,42	161,76	235,57
1,36	1,05	0,41	1,17	180,00	173,00	88,00	218,00	132,35	164,76	214,63	186,32
0,10	0,88	0,14	0,66	40,00	151,00	38,00	121,00	400,00	171,59	271,42	183,33
0,41	1,07	0,80	1,04	75,00	189,00	110,00	134,00	182,92	176,63	137,50	128,84
1,00	1,54	0,83	2,07	139,00	215,00	148,00	368,00	139,00	139,61	178,31	177,77
0,82	1,82	0,89	1,56	130,00	285,00	200,00	287,00	158,53	156,59	224,71	183,97
1,07	3,40	1,14	1,38	164,00	798,00	225,00	216,00	153,27	234,70	197,36	156,52
1,57	1,43	0,68	1,48	267,00	267,00	100,00	269,00	170,06	186,71	147,05	181,75
0,17	1,39	0,94	1,23	58,00	223,00	138,00	187,00	341,17	160,43	146,80	152,03
0,35	1,95	0,95	0,71	97,00	333,00	185,00	108,00	277,14	170,76	194,73	152,11
0,24	1,46	1,58	1,49	88,00	254,00	265,00	223,00	366,66	173,97	167,72	149,66
1,01	1,58	1,23	1,13	150,00	261,00	185,00	135,00	148,51	165,18	150,40	119,46
1,55	1,66	0,54	1,14	238,00	267,00	110,00	203,00	153,54	160,84	203,70	178,07
0,98	2,02	0,72	1,26	146,00	311,00	120,00	251,00	148,97	153,96	166,66	199,20
Peso	Peso	Peso	Peso	Plant.	Plant.	Plant.	Plant.	Plant/g	Plant/g	Plant/g	Plant/g

Tabela 10. Dados originais para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento ANA (12,0 μ M), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μ Mol, em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M
0,82	0,85	0,78	0,49	71,00	104,00	66,00	34,00	86,58	122,35	84,61	69,38
0,96	0,75	0,77	0,77	131,00	39,00	85,00	56,00	136,45	52,00	110,38	72,72
0,78	0,68	0,69	0,59	61,00	106,00	67,00	48,00	78,20	155,88	97,10	81,35
0,58	0,50	0,84	0,75	41,00	37,00	51,00	62,00	70,68	74,00	60,71	82,66
0,46	0,67	0,58	0,82	63,00	73,00	83,00	121,00	136,95	108,95	148,27	147,56
0,57	0,69	0,54	0,61	52,00	64,00	65,00	54,00	91,22	92,75	120,37	88,52
0,99	0,68	0,74	0,70	75,00	77,00	48,00	87,00	75,75	113,23	64,86	124,28
0,86	0,75	0,73	0,78	94,00	101,00	57,00	94,00	109,30	140,00	78,08	120,51
0,58	0,90	0,79	0,61	46,00	127,00	80,00	59,00	79,31	141,11	101,26	96,72
1,08	0,64	0,71	0,67	91,00	78,00	75,00	48,00	84,25	121,87	105,63	71,64
0,76	1,12	0,73	0,57	97,00	83,00	139,00	62,00	127,63	74,10	190,41	108,77
0,64	0,86	0,80	0,63	71,00	94,00	109,00	61,00	110,93	109,30	136,25	96,82
0,94	0,73	0,68	0,81	108,00	78,00	103,00	89,00	114,89	106,84	151,47	109,87
0,77	0,60	1,06	0,60	112,00	62,00	131,00	54,00	145,45	103,33	123,58	90,00
0,83	0,70	0,67	0,68	93,00	29,00	101,00	70,00	112,04	41,42	150,74	102,94
0,81	1,01	1,08	1,10	48,00	146,00	105,00	123,00	59,25	144,55	97,22	111,81
0,49	0,96	0,74	0,93	44,00	157,00	77,00	105,00	89,79	163,54	104,05	112,90
0,67	1,05	0,99	0,74	38,00	158,00	121,00	84,00	56,71	150,47	122,22	113,51
0,98	1,15	0,52	0,72	116,00	159,00	88,00	87,00	118,36	138,26	169,23	120,83
1,05	1,07	0,77	0,76	149,00	111,00	112,00	86,00	141,90	103,73	145,45	113,15
0,88	1,01	1,41	1,42	113,00	107,00	139,00	214,00	139,50	105,94	98,58	150,70
0,70	1,08	0,95	0,70	55,00	166,00	114,00	76,00	78,57	153,70	120,00	108,57
0,86	0,83	0,81	0,84	116,00	155,00	95,00	131,00	134,88	186,74	117,28	155,95
0,50	1,15	1,14	0,97	31,00	144,00	171,00	144,00	62,00	125,21	150,00	148,45
0,88	1,09	1,12	1,16	111,00	125,00	137,00	135,00	126,13	114,67	122,38	116,37
0,69	1,26	0,78	0,99	73,00	173,00	133,00	129,00	105,79	137,30	170,51	130,30
0,87	0,89	1,54	0,94	49,00	97,00	154,00	118,00	56,32	108,98	100,00	125,53
1,31	1,17	1,16	0,71	148,00	133,00	111,00	67,00	112,97	113,67	95,68	94,36
1,10	1,09	1,33	1,09	99,00	128,00	130,00	165,00	9,00	117,43	97,74	151,37
0,63	1,09	1,43	0,88	104,00	108,00	174,00	103,00	165,07	99,08	121,67	117,04
Peso	Peso	Peso	Peso	Plant.	Plant.	Plant.	Plant.	Plant/g	Plant/g	Plant/g	Plant/g

Tabela 11. Dados originais para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento AG₃ (6,0 μM), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μMol em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

0 μM	5 μM	10 μM	15 μM	0 μM	5 μM	10 μM	15 μM	0 μM	5 μM	10 μM	15 μM
0,59	0,21	0,92	0,18	139,00	150,00	150,00	112,00	235,59	714,29	163,04	622,22
0,52	0,18	1,14	0,46	129,00	86,00	158,00	158,00	248,08	477,78	138,60	343,48
0,46	0,17	0,87	1,03	119,00	52,00	145,00	269,00	258,70	305,88	166,67	261,17
0,31	0,34	0,61	0,54	83,00	95,00	133,00	166,00	267,74	279,41	218,03	307,41
0,63	0,77	0,66	1,34	151,00	209,00	146,00	300,00	239,68	271,43	221,21	223,88
0,51	0,25	1,13	0,20	128,00	111,00	262,00	92,00	250,98	444,00	231,86	460,00
0,40	0,37	0,63	0,18	105,00	166,00	129,00	101,00	262,50	448,65	204,76	561,11
0,72	0,26	0,41	0,21	98,00	99,00	53,00	52,00	136,11	380,77	129,27	247,62
0,71	1,04	0,42	0,18	122,00	265,00	111,00	75,00	171,83	254,81	264,29	416,66
0,80	0,34	0,72	1,33	140,00	117,00	230,00	301,00	175,00	344,12	319,44	225,80
0,61	0,36	0,34	1,92	95,00	85,00	82,00	512,00	155,74	236,11	241,18	266,67
0,42	0,20	0,65	0,28	50,00	31,00	85,00	143,00	119,05	155,00	130,77	510,71
0,77	0,47	0,48	0,25	84,00	128,00	97,00	126,00	109,09	272,34	202,08	504,00
0,72	0,30	0,31	0,37	97,00	122,00	110,00	153,00	134,72	406,67	354,84	413,51
0,93	0,49	0,55	0,20	153,00	78,00	100,00	42,00	164,52	159,18	181,82	210,00
1,60	0,74	0,40	0,30	294,00	147,00	124,00	121,00	183,75	198,65	310,00	403,33
0,83	0,54	0,63	0,40	89,00	175,00	165,00	147,00	107,23	324,07	261,90	367,50
0,35	0,84	1,05	0,98	91,00	285,00	248,00	215,00	77,38	339,29	236,19	219,39
0,84	0,79	1,53	1,88	65,00	136,00	458,00	396,00	77,38	172,15	299,35	210,64
0,71	1,49	0,55	0,76	81,00	309,00	181,00	157,00	114,08	207,38	329,09	206,58
0,58	1,40	1,30	0,33	97,00	298,00	263,00	107,00	167,24	212,86	203,31	324,24
0,84	0,68	0,55	1,07	108,00	211,00	178,00	167,00	128,57	310,29	323,64	156,07
1,11	0,34	0,29	1,65	119,00	120,00	76,00	185,00	107,21	352,94	262,07	112,12
0,99	0,98	0,28	1,83	107,00	209,00	92,00	173,00	108,08	213,27	328,57	94,54
0,53	1,26	0,21	0,82	93,00	291,00	113,00	157,00	157,47	230,95	538,10	191,46
0,95	1,15	0,31	1,50	160,00	185,00	104,00	253,00	168,42	160,87	335,48	168,67
0,83	0,68	1,51	0,85	134,00	119,00	379,00	143,00	161,45	175,00	250,99	168,24
0,72	0,78	1,54	0,53	109,00	110,00	383,00	126,00	151,39	141,03	248,70	237,54
0,67	1,19	1,44	0,94	115,00	189,00	206,00	238,00	171,64	158,82	143,06	235,19
0,81	1,56	0,70	1,57	146,00	327,00	143,00	278,00	180,25	209,62	204,29	177,07
Peso	Peso	Peso	Peso	Plant.	Plant.	Plant.	Plant.	Plant/g	Plant/g	Plant/g	Plant/g

Tabela 12. Dados originais para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento ANA (2,0 µM) e BAP (4,0 µM), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µMol, em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

0 µM	5 µM	10 µM	15 µM	0 µM	5 µM	10 µM	15 µM	0 µM	5 µM	10 µM	15 µM
0,95	1,14	1,03	0,90	140,00	121,00	158,00	149,00	147,36	106,14	153,39	165,55
0,90	1,26	0,94	0,93	155,00	290,00	169,00	145,00	172,22	230,15	179,78	155,91
0,98	0,53	0,72	0,95	188,00	146,00	138,00	153,00	191,83	275,47	191,66	161,05
0,82	0,77	0,87	0,99	110,00	132,00	167,00	169,00	134,14	171,42	191,95	170,70
0,86	0,80	1,00	1,02	90,00	166,00	175,00	143,00	104,65	207,50	175,00	140,19
0,96	0,88	1,47	0,20	160,00	174,00	244,00	55,00	166,66	197,72	165,98	275,00
0,96	0,97	1,15	1,16	170,00	182,00	269,00	178,00	177,08	187,62	233,91	153,44
0,55	1,13	1,16	1,51	87,00	223,00	232,00	190,00	158,18	197,34	200,00	125,82
1,33	1,27	1,05	0,85	226,00	263,00	261,00	154,00	169,92	207,08	248,57	181,17
1,21	0,85	1,29	1,58	97,00	171,00	266,00	226,00	80,16	201,17	206,20	143,03
0,99	1,48	0,92	1,28	107,00	336,00	212,00	194,00	108,08	227,02	230,43	151,56
0,53	1,67	0,93	1,12	45,00	345,00	205,00	193,00	84,90	206,58	220,43	172,32
1,25	1,28	0,97	1,42	213,00	258,00	228,00	245,00	170,40	201,56	235,05	172,53
1,32	0,95	1,45	1,11	234,00	236,00	316,00	152,00	177,27	248,42	217,93	136,93
0,97	1,02	1,35	0,84	197,00	173,00	309,00	163,00	203,09	169,60	228,88	194,04
1,27	0,38	1,26	1,10	196,00	101,00	302,00	145,00	154,33	265,78	239,68	131,81
1,22	0,19	1,36	1,20	330,00	70,00	269,00	137,00	270,49	368,42	197,79	114,16
1,07	1,52	1,13	0,96	143,00	364,00	236,00	171,00	133,64	239,47	208,84	178,12
0,93	0,59	1,23	0,82	166,00	123,00	194,00	184,00	178,49	208,47	157,72	224,39
1,49	1,49	1,38	0,77	344,00	221,00	526,00	141,00	230,87	148,32	185,50	183,11
0,94	0,84	1,20	0,35	226,00	177,00	204,00	75,00	240,42	210,71	170,00	214,28
1,11	0,19	1,00	1,06	205,00	65,00	161,00	180,00	184,68	342,10	161,00	169,81
1,42	1,79	1,05	0,74	226,00	318,00	190,00	160,00	159,15	177,65	180,95	216,21
2,23	0,85	1,10	1,06	348,00	184,00	227,00	192,00	156,05	216,47	206,36	181,13
1,21	2,23	0,98	1,39	273,00	446,00	189,00	248,00	225,61	200,00	192,85	178,41
1,48	1,35	1,18	0,67	339,00	241,00	211,00	157,00	229,05	178,51	178,81	234,32
1,18	1,06	1,19	1,49	237,00	195,00	253,00	155,00	200,84	183,96	212,60	104,02
1,51	1,41	1,46	0,19	315,00	252,00	267,00	73,00	208,60	178,72	182,87	384,21
1,00	1,47	0,95	0,90	202,00	275,00	182,00	179,00	202,00	187,07	191,57	198,88
1,26	1,67	1,03	0,91	238,00	304,00	196,00	132,00	188,88	182,03	190,29	145,05
Peso	Peso	Peso	Peso	Plant.	Plant.	Plant.	Plant.	Plant/g	Plant/g	Plant/g	Plant/g

Tabela 13. Dados originais para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento KIN (12,0 μ M), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μ Mol em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M
0,72	0,28	0,10	0,79	157,00	28,00	15,00	125,00	218,05	100,00	150,00	158,22
0,56	0,19	0,20	0,73	112,00	18,00	47,00	108,00	200,00	94,73	235,00	147,94
0,54	0,22	0,19	0,85	60,00	36,00	118,00	143,00	111,11	163,63	621,00	168,23
0,45	0,11	0,28	0,77	163,00	34,00	69,00	154,00	362,22	309,09	246,42	200,00
0,64	0,33	0,23	0,52	159,00	59,00	35,00	139,00	248,43	193,10	152,17	267,30
0,84	0,29	0,11	1,09	163,00	56,00	17,00	276,00	194,04	178,78	154,54	253,21
0,52	0,26	0,48	0,50	121,00	59,00	54,00	101,00	232,69	226,92	112,50	202,00
0,62	0,62	0,09	1,01	89,00	127,00	21,00	234,00	143,54	204,83	233,33	231,68
0,11	0,75	0,32	0,66	46,00	169,00	52,00	161,00	418,18	225,33	162,50	243,93
0,49	0,47	0,38	0,45	92,00	156,00	66,00	170,00	187,75	331,91	173,68	377,77
0,91	0,15	0,64	0,34	176,00	33,00	128,00	114,00	193,40	220,00	200,00	335,29
0,11	0,49	0,44	0,65	53,00	78,00	107,00	175,00	481,81	159,18	243,18	269,23
0,51	0,50	0,66	1,20	112,00	90,00	117,00	317,00	219,60	180,00	177,27	264,16
0,90	0,29	0,27	0,69	171,00	92,00	80,00	139,00	190,00	317,24	296,29	201,44
0,99	0,39	0,37	0,28	149,00	104,00	58,00	107,00	150,50	266,66	156,75	382,14
0,65	0,90	0,63	0,57	107,00	162,00	77,00	118,00	305,71	180,00	122,22	207,01
1,34	0,36	0,82	0,62	281,00	72,00	180,00	181,00	209,70	200,00	219,51	291,93
0,58	0,21	0,40	0,67	102,00	105,00	67,00	148,00	175,86	500,00	167,50	220,89
0,13	0,79	0,58	0,73	61,00	125,00	135,00	115,00	469,23	158,22	232,75	157,53
0,68	0,39	0,77	0,65	170,00	42,00	204,00	143,00	250,00	107,69	264,93	220,00
0,39	0,86	0,34	0,45	146,00	201,00	93,00	79,00	374,35	233,72	273,52	175,55
0,74	0,28	0,54	0,71	174,00	108,00	172,00	153,00	235,13	385,71	318,51	215,49
0,77	0,40	0,38	0,57	237,00	110,00	93,00	105,00	307,79	275,00	244,73	184,21
0,16	0,19	0,41	0,16	43,00	53,00	123,00	30,00	268,75	278,94	300,00	187,50
0,43	0,17	0,52	0,74	157,00	34,00	101,00	127,00	365,11	200,00	194,23	171,62
0,18	0,20	0,71	0,41	47,00	43,00	219,00	87,00	261,11	215,00	308,45	212,19
0,45	1,02	0,63	0,55	113,00	150,00	151,00	92,00	251,11	147,05	239,68	167,27
0,36	0,18	0,37	0,04	92,00	21,00	117,00	10,00	255,55	116,66	316,21	250,00
1,43	0,53	0,55	0,51	256,00	32,00	119,00	114,00	179,02	60,37	216,36	223,52
0,70	0,64	0,59	0,53	184,00	96,00	91,00	103,00	262,85	150,00	154,23	194,33
Peso	Peso	Peso	Peso	Plant.	Plant.	Plant.	Plant.	Plant/g	Plant/g	Plant/g	Plant/g

Tabela 14. Dados originais para peso médio (g) de brotos, número total de brotos e número de brotos convertidas por grama de microgemas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas anteriormente em meio de cultura basal suplementado com o tratamento 2IP (12,0 μ M), cultivadas *in vitro*, em resposta à diferentes concentrações de AG₃: 0,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μ Mol em meio de cultura basal semi-sólido, 60 dias após a inoculação. LFDGV/CCA/UFSC, 2000.

0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	0 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M
0,79	0,63	1,20	0,51	156,00	114,00	232,00	62,00	197,43	180,95	193,33	121,56
0,97	0,87	1,09	0,76	154,00	133,00	151,00	113,00	158,76	152,87	138,53	148,68
1,08	1,01	0,17	0,51	172,00	154,00	44,00	64,00	159,25	152,47	258,82	125,49
0,79	0,85	0,56	0,78	195,00	134,00	114,00	108,00	246,83	157,64	203,57	138,46
1,02	0,87	0,89	1,27	237,00	137,00	126,00	199,00	232,35	157,47	141,57	156,69
0,54	0,66	0,32	0,72	101,00	121,00	85,00	131,00	187,03	183,33	265,62	181,94
0,89	0,67	1,07	0,54	144,00	131,00	159,00	48,00	161,79	195,00	148,59	88,88
1,19	0,69	0,68	0,55	180,00	142,00	91,00	80,00	151,26	205,79	133,82	145,45
0,91	0,71	0,32	1,13	125,00	105,00	56,00	172,00	137,36	147,88	175,00	152,21
0,86	1,36	1,03	1,20	183,00	155,00	152,00	188,00	212,79	113,97	147,57	156,66
0,94	0,73	0,20	0,59	125,00	146,00	53,00	98,00	132,97	200,00	265,00	166,10
0,60	0,51	0,81	0,50	104,00	72,00	107,00	103,00	173,33	141,17	132,09	206,00
0,95	0,85	1,06	0,86	172,00	83,00	152,00	125,00	181,05	97,64	143,39	145,34
0,70	1,11	1,02	1,02	131,00	164,00	117,00	153,00	187,14	147,74	114,70	150,00
0,74	0,46	0,54	1,07	143,00	106,00	75,00	166,00	193,24	230,43	138,88	155,14
0,91	0,43	0,64	0,94	159,00	97,00	72,00	173,00	174,72	225,58	112,50	184,04
0,97	0,38	0,66	0,91	116,00	81,00	105,00	115,00	119,58	213,15	159,09	126,37
0,30	1,05	0,89	0,87	93,00	170,00	108,00	130,00	310,00	161,90	121,34	149,42
0,92	0,84	0,38	0,71	102,00	116,00	85,00	108,00	110,86	138,09	223,68	152,11
1,28	0,74	0,44	0,76	215,00	124,00	81,00	133,00	167,96	167,56	184,09	175,00
0,95	0,72	0,20	1,05	170,00	119,00	50,00	149,00	178,94	165,27	250,00	141,90
0,89	0,67	0,96	0,81	206,00	140,00	138,00	113,00	231,46	208,95	143,75	139,50
1,06	0,80	0,96	0,82	168,00	115,00	166,00	107,00	158,49	143,75	172,91	130,48
0,58	0,57	0,53	1,11	114,00	92,00	102,00	148,00	196,55	161,40	192,45	133,33
0,58	0,68	0,47	0,71	123,00	123,00	80,00	131,00	212,06	180,88	170,21	184,50
1,04	0,55	1,50	1,17	181,00	104,00	217,00	155,00	174,03	189,09	144,66	132,47
1,33	0,62	1,27	0,81	124,00	108,00	212,00	125,00	160,90	174,19	166,92	154,32
1,31	0,70	0,53	0,76	159,00	112,00	75,00	119,00	121,37	160,00	141,50	156,57
1,20	0,57	1,04	1,08	180,00	106,00	150,00	160,00	150,00	185,96	144,23	148,14
0,88	0,40	0,31	1,12	135,00	96,00	67,00	138,00	153,40	240,00	216,12	123,21
Peso	Peso	Peso	Peso	Plant.	Plant.	Plant.	Plant.	Plant/g	Plant/g	Plant/g	Plant/g