

Jenny Paola Corredor Prado

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOQUÍMICA DA
GERMINAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL *IN*
VITRO E FORMAÇÃO DE CULTURAS NODULARES EM
Vriesea friburgensis Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith E
Vriesea reitzii Leme & A. Costa**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Rosete Pescador

Coorientador: Prof. Dr. Lício Luiz Dal Vesco

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

C824c Corredor, Jenny Paola

Caracterização morfo-histoquímica da germinação e o desenvolvimento pós-seminal in vitro e formação de culturas nodulares em *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith e *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa [dissertação] / Jenny Paola Corredor ; orientador, Rosete Pescador. - Florianópolis, SC, 2012.
103 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos genéticos vegetais. 2. Bromeliácea - Propagação in vitro. 3. Sementes. I. Pescador, Rosete. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631

*A minha mãe e ao meu irmão dedico.
Ao meu companheiro e amigo ofereço.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela acolhida, pela formação acadêmica e por possibilitar a realização do mestrado.

Aos meus orientadores Profa. Dra. Rosete Pescador e Prof. Dr. Lírio Dal Vesco pela orientação e colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pelos ensinamentos e a oportunidade de fazer parte do RGV.

Ao Dr. Eder Carlos Schmidt pela coorientação e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Douglas André Steinmacher pela coorientação, estímulo e colaboração.

À Profa. Dra. Zenilda Bouzon, do Centro de Ciências Biológicas, pelas sugestões e por disponibilizar as dependências do Laboratório de algas marinhas.

Ao Laboratório de fisiologia do desenvolvimento e de genética vegetal (LFDGV), Laboratório de algas marinhas (LAMAR), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e ao Laboratório de Sementes da UFSC, pelo espaço disponibilizado e pelos ensinamentos.

Aos colegas do curso de mestrado, e aos colegas do LFDGV, do LAMAR e do Laboratório de Sementes pelo apoio e ajuda durante minha aprendizagem.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A minha família e às pessoas queridas pelo incentivo e o constante apoio.

RESUMO

O progressivo processo de devastação da Mata Atlântica, e os efeitos ornamentais e paisagísticos das bromélias, têm ocasionado a diminuição de suas populações até ter atualmente muitas espécies sob ameaça de extinção. Assim, considerando a importância das Bromeliáceas no cenário nacional, bem como, da conservação da biodiversidade faz-se necessário continuar com os estudos de propagação destas espécies. Portanto, este trabalho objetivou avaliar os aspectos morfológicos e histoquímicos da germinação *in vitro* e o desenvolvimento pós-seminal em *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, assim como da formação de culturas nodulares (CN) a partir de sementes e explantes foliares das bromélias *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* e *Vriesea reitzii*. As sementes foram coletadas de frutos maduros de *V. friburgensis* var. *paludosa*, mantidas na coleção de bromélias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Também foram utilizadas brotações jovens de *Vriesea reitzii*, pertencentes à Coleção de Bromélias *in vitro* do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV). O meio de cultura usado foi constituído pela formulação de nutrientes minerais de MS, adicionado de vitaminas de Morel e sacarose. Para a germinação das sementes, usou-se meio de cultura isento de reguladores de crescimento, ao contrário dos meios usados para indução de CN os quais foram suplementados com diferentes concentrações de ANA, BAP e 2IP. Entre os resultados obtidos, observou-se em *V. friburgensis* var. *paludosa* uma germinação epígea criptocotiledonar, com porcentagem acima de 97%, peso de mil sementes de 683,8 mg, e um IVG de 21,43. Suas sementes são pequenas medindo $4,4 \pm 0,06$ mm de comprimento e $0,5 \pm 0,01$ mm de largura, fusiformes, com apêndices plumosos e tegumento de cor castanho. Observou-se a germinação no dia 3º após a inoculação no meio. No dia 12º iniciou-se a emergência do primeiro eofilo e no dia 18º do segundo eofilo. As sementes são bitementadas e observou-se no seu tegumento principalmente compostos fenólicos. No citoplasma das células do endosperma observou-se o acúmulo de amido como principal composto de reserva, distribuído em amiloplastos e que junto com as proteínas mostraram uma diminuição gradual durante a formação da plântula. O endosperma está rodeado pela camada de aleurona, com células que apresentam grande quantidade de proteínas e lipídios. Identificou-se também no endosperma uma camada de células empilhadas próximas ao embrião, indicando que também poderia desempenhar um papel na regulação do crescimento embrionário. O embrião apresentou-se pouco

diferenciado na semente madura, com um cotilédone haustorial que além da função de absorver e conduzir as reserva do endosperma para o embrião, possivelmente também esteja relacionado com o fornecimento de enzimas hidrolíticas. Enquanto à maior taxa de indução de CN a partir de sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa*, a suplementação de ANA (4 μ M) no meio de cultura resultou em 72%. Observou-se que primeiro o embrião inicia o processo de germinação, e após este processo dá início ao desenvolvimento das culturas nodulares. A partir da observação destes eventos pode-se inferir que a origem das CN a partir da semente está relacionada com os meristemas radicular e caulinar, e quando formadas a partir dos explantes foliares estão envolvidos os meristemas intercalar e marginal. Portanto, o presente estudo contribui para a ampliação da base de conhecimentos sobre as bromélias nativas da Mata Atlântica, especialmente nos processos de estabelecimento das plântulas e sobre a propagação *in vitro* mediante o sistema regenerativo das culturas nodulares. Estas informações constituem ferramentas úteis para estudos biológicos, taxonômicos, ecológicos e de tecnologia de sementes e também podem auxiliar o aprimoramento nos processos de micropropagação. Estes conhecimentos são importantes para o estudo aplicado à conservação, propagação e ao manejo das bromélias.

Palavras-chave: bromélia, cultura nodular, micropropagação, plântula, semente, *Vriesea*.

ABSTRACT

The gradual process of destruction of the Mata Atlantica and the landscape and ornamental effects of the bromeliads have caused the decline of their populations, leading many species to be under threat of extinction. Thus, considering the importance of Bromeliaceae on the national scene, as well as the biodiversity conservation, it is necessary to continue the propagation studies of these species. Therefore, this study aimed to evaluate the morphological and histochemical aspects of the *in vitro* germination and post-seminal development of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, as well as the formation of nodular cultures (NC) from seeds and foliar explants from the bromeliad *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* and *Vriesea reitzii*. Seeds were collected from mature fruits of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, kept in the collection of bromeliads at the Center for Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina. Young shoots of *Vriesea reitzii* were also used, belonging to the collection of *in vitro* bromeliads of the Laboratory of Developmental Physiology and Plant Genetics (LFDGV). The culture medium used was constituted by the formulation of mineral nutrients MS supplemented with vitamins Morel and sucrose. For germination, it was used growth regulators-free culture medium. Differently, the culture mediums used to induce NC were supplemented with different concentrations of NAA, BA and 2iP. For the induction of NC from foliar explants of *V. reitzii*, NAA (4 μ M) + BAP (2 μ M) were added into the medium. Among the results, it was observed a cryptocotyledonary epigeal germination in *V. friburgensis* var. *paludosa*, with percentages above 97%, thousand seed weights of 683.8 mg and speed germination index of 21.43. The seeds of this species are small, measuring 4.4mm (\pm 0.06) length and 0.5mm (\pm 0.01) wide, fusiform, with feathery appendages and show brown seed coat. On the third day after inoculation in the medium, it was observed seed germination. In the twelfth day, it was observed the emergence of the first eophyll and in the eighth day the second eophyll. The seeds are bitegmic and their tegument show phenolic compounds. In the cytoplasm of the endosperm cells it was observed an accumulation of starch as the main reserve compound, distributed in amyloplasts and, as the proteins it showed a gradual decrease during the formation of the seedling. The endosperm is surrounded by the aleurone layer, with cells that show large amounts of proteins and lipids. It was also found in the endosperm a layer of stacked cells next to the embryo, indicating that it could also play a role in regulating the embryo growth. The embryo was poorly differentiated in the mature seed, and showed a

haustorial cotyledon that besides the function of absorbing and conducting the reserve of the endosperm to the embryo, possibly it could be related to the supply of hydrolytic enzymes. The induction rate of the nodular culture (NC) from the seeds of *V. friburgensis* var. *paludosa* in culture medium with supplementation of ANA (4 μ M) resulted in 72%. It was observed that the embryo initiates the germination process and then the development of the NCs starts. From the observation of these events it can be inferred that the origin of NC from the seed is related to the stem and root meristems, and when formed from leaf explants are involved intermediate and marginal meristems. Therefore, this study helps to expand the knowledge base of native bromeliads on the Mata Atlantica, especially in the processes of seedling establishment and the propagation *in vitro* by NC regenerative system. These informations are useful tools for biological, taxonomic, ecological and seed technology studies and can also assist in the improvement of micropropagation processes. This knowledge is important for the study applied to the conservation, propagation and management of bromeliads.

Keywords: bromeliad, nodular culture, micropropagation, seedling, seed, *Vriesea*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspectos morfológicos da *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* no estado reprodutivo. 37
- Figura 2.** Percentual de germinação *in vitro* e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* durante 15 dias de cultivo. 38
- Figura 3.** Germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*. 41
- Figura 4.** Secções longitudinais da semente madura de *V. friburgensis* var. *paludosa* 59
- Figura 5.** Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de Azul de toluidina (ATO) durante os dias de inoculação no meio de cultura. 62
- Figura 6.** Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de Sudan Black B (SB-B) durante os dias de inoculação no meio de cultura. 62
- Figura 7.** Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de Ácido periódico de schiff (PAS) durante os dias de inoculação no meio de cultura. 63
- Figura 8.** Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de lugol durante os dias de inoculação no meio de cultura. 63
- Figura 9.** Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de Azul brilhante de coomassie (CBB) durante os dias de inoculação no meio de cultura. ... 65
- Figura 10.** Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas à coloração dupla de PAS e CBB durante os dias de inoculação no meio de cultura. 65
- Figura 11.** Secções longitudinais do embrião e endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa*..... 69

Figura 12. Secções longitudinais durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal de <i>V. friburgensis</i> var. <i>paludosa</i>	69
Figura 13. Secções longitudinais do cotilédone haustorial de <i>V. friburgensis</i> var. <i>paludosa</i>	72
Figura 14. Semente de <i>V. friburgensis</i> var. <i>paludosa</i> em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	72
Figura 15. Secções longitudinais da semente de <i>V. friburgensis</i> var. <i>paludosa</i> analisadas em microscopia de fluorescência.	74
Figura 16. Porcentagem de indução de CN e de formação de plântulas a partir de sementes de <i>V. friburgensis</i> var. <i>paludosa</i> em diferentes meios de cultura, após 6 semanas de cultivo.	89
Figura 17. Sementes de <i>V. friburgensis</i> var. <i>paludosa</i> após 6 semanas de cultivo <i>in vitro</i>	90
Figura 18. Indução de CN a partir de sementes de <i>V. friburgensis</i> var. <i>paludosa</i> inoculadas no meio de cultura MSB suplementado com ANA (4µM)	90
Figura19. Indução de CN em explantes foliares de <i>V. reitzii</i> inoculadas no meio de cultura MSB suplementado com ANA (4µM) e BAP (2 µM)	94

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dimensões médias, peso, percentual e velocidade de germinação (IVG) das sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.36
- Tabela 2.** Testes histoquímicos aplicados nas sementes durante a germinação *in vitro* e o desenvolvimento pós-seminal de *V. friburgensis* var. *paludosa*.56
- Tabela 3.** Compostos visualizados através dos testes histoquímicos nas sementes *V. friburgensis* var. *paludosa*.57
- Tabela 4.** Concentrações e combinações de reguladores de crescimento nos tratamentos para a indução das culturas nodulares a partir de sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido indolil-3-acético
ANA	Ácido α -naftalenoacético
ANOVA	Análise da Variância
ATO	Azul de toluidina
BAP	6-benzilaminopurina
CBB	Azul brilhante de coomassie
CN	Cultura Nodular
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
GA ₃	Ácido Giberélico
IVG	Índice de velocidade de germinação
MC	Microscópio Confocal
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
ML	Microscópio de luz
MSB	Meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) básico
PAS	Ácido periódico de schiff
SB-B	Sudan Black-B
μ M	Micromolar
°C	Grau(s) celsius
2,4-D	2,4-ácido diclorofenoxiacético
2ip	2-isopentenil adenina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivo Geral	24
1.1.2 Objetivos Específicos	24
1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
2 CAPÍTULO I: MORFOLOGIA DA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E O DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DA BROMÉLIA <i>Vriesea friburgensis</i> Mez var. <i>paludosa</i> (L.B. Smith) L.B. Smith	31
2.1 INTRODUÇÃO	32
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.2.1 semente	33
2.2.2 Condições de germinação <i>in vitro</i>	34
2.2.3 Análise morfométrica da semente	34
2.2.4 Avaliação da germinação <i>in vitro</i>	35
2.2.5 Morfologia da germinação <i>in vitro</i> e o desenvolvimento pós-seminal	35
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
2.3.1 Análise morfológica da semente	35
2.3.3 Morfologia da germinação <i>in vitro</i> e o desenvolvimento pós-seminal	40
2.4 CONCLUSÃO	43
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
3. CAPÍTULO II: ANÁLISE MORFO-HISTOQUÍMICA DA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E DO DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL EM <i>Vriesea friburgensis</i> Mez var. <i>paludosa</i> (L.B. Smith) L.B. Smith	51
3.1 INTRODUÇÃO	52
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.2.1 Semente	54
3.2.2 Condições de germinação <i>in vitro</i>	54
3.2.3. Análise em microscopia de luz	55
3.2.3.1 Testes histoquímicos	55
3.2.4. Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	55
3.2.5. Análise em microscópio de fluorescência	56
3.2.6. Análise em microscópio confocal (MC)	56

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.3.1 Análise em microscópio de luz	57
3.3.2 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	71
3.3.3 Análises em microscópio de fluorescência	73
3.3.4 Análises em microscópio confocal	74
3.4. CONCLUSÃO	75
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

4. CAPÍTULO III: HISTODIFERENCIAÇÃO DE CULTURAS NODULARES A PARTIR DE SEMENTES E EXPLANTES FOLIARES EM *Vriesea* **83**

4.1 INTRODUÇÃO	84
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	85
4.2.1 Condições de cultivo <i>in vitro</i>	85
4.2.2 Indução de cultura nodular a partir de Sementes de <i>Vriesea friburgensis</i> var. <i>paludosa</i>	86
4.2.3. Indução de cultura nodular a partir de explantes foliares de <i>Vriesea reitzii</i>	87
4.2.4 Caracterização morfológica da formação das culturas nodulares	87
4.2.5. Análise histoquímica da formação das culturas nodulares em microscópio de luz (ML)	87
4.2.6. Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	87
4.2.7. Análise em microscópio confocal (MC)	88
4.3 RESULTADOS	88
4.3.1 Indução de cultura nodular a partir de explantes de semente <i>Vriesea friburgensis</i> var. <i>paludosa</i>	88
4.3.2. Caracterização morfológica e histoquímica da formação das culturas nodulares em semente de <i>Vriesea friburgensis</i> var. <i>paludosa</i>	89
4.3.3 Indução e caracterização morfológica e histoquímica da formação das culturas nodulares a partir de explantes foliares de <i>Vriesea reitzii</i>	93
4.4 CONCLUSÃO	97
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS 103

1 INTRODUÇÃO

O bioma Mata Atlântica contém alta biodiversidade e endemismo de espécies e está entre os 25 *hotspots* em riqueza e em número de espécies do planeta, estimando-se nele a existência de 20.000 espécies de plantas, das quais 8.000 (40%) são endêmicas (MYERS et al., 2000). Porém, este bioma é um dos mais ameaçados e, como consequência do avanço dos maiores centros urbanos e rurais do Brasil, foi o que mais sofreu com perdas florestais (SILVA & TABARELLI, 2000; METZGER, 2009). O progressivo processo de devastação observado neste bioma e seus ecossistemas associados causaram redução significativa em sua biodiversidade. Esta perda também foi observada na flora epífita, rica em espécies da família Bromeliaceae (COFFANI NUNES, 2002).

As bromélias são importantes componentes da Floresta Tropical Atlântica, encontrando-se associadas as mais variadas formas de vida (REITZ, 1983). Elas consistem em um subsistema ecológico complexo que contribui para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais, por apresentarem alto grau de especialização em função de sua adaptação às condições climáticas e oligotróficas extremas (PADILHA, 1978). O corpo de tamanho reduzido, hábito rizomatoso, caule fitotélmico, tricomas para absorção foliar, adaptações específicas de seu metabolismo (fotossíntese via CAM), suculência e outras adequações xeromórficas são características que determinam o sucesso de colonização das bromélias em ambientes e situações tão diversos e, freqüentemente estressantes (BENZIG, 2000). De acordo com Hay & Lacerda (1980), as bromélias tem um potencial importante para o estabelecimento e crescimento de diferentes espécies que se desenvolvem em pequenas áreas, pois elas apresentam fonte de água acumulada em seu tanque, nutrientes e proteção física para as plântulas (FIALHO & FURTADO, 1993). Assim, permitem interações de diferentes modos com diversos tipos de organismos, conferindo a elas um importante papel ecológico (ROCHA et al., 1997).

Pelo menos nove categorias de usos não exclusivos podem ser associadas a esta família, incluindo ser fonte de fibras, alimentos, forragem e medicamentos, além de uso ornamental e místico (BENNETT, 2000). Estas categorias refletem, principalmente, antigas aplicações e percepções indígenas e nem sempre coincidem com o seu uso moderno (BENZIG, 2000). Nas últimas décadas, suas belas formas e cores, baixa manutenção e fácil adaptação a pequenos jardins levou as bromélias ao uso como plantas ornamentais no mundo inteiro. Porém,

enquanto o comércio pode fazer contribuições significativas para as economias domésticas em zonas rurais, o mesmo pode representar uma ameaça significativa em alguns dos países *hotspot* da biodiversidade de bromélias como o Brasil, Bolívia e Colômbia (NEGRELLE et al., 2012).

A família Bromeliaceae apresenta 58 gêneros e 3.172 espécies e subespécies (LUTHER, 2008). Ocorrem preferencialmente nas zonas tropicais, estendendo-se desde a América do Norte até a América do Sul, sendo apenas uma espécie de ocorrência no continente africano, a *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed (BENZING, 2000). O Brasil detém um elevado número de representantes de Bromeliaceae, estimando-se a ocorrência de cerca de 70% dos gêneros e 40% das espécies, distribuídos especialmente na região Sudeste (WANDERLEY & MARTINS 2007). Taxonomicamente as bromélias estão divididas em três subfamílias: Pitcairnioidae, Bromelioideae e Tillandsioidae, baseando-se em análises comparativas entre as estruturas reprodutivas (REITZ, 1983).

No Estado de Santa Catarina, são encontradas 137 espécies de bromélias, que estão presentes desde a restinga no litoral até a Mata Pluvial Subtropical do Rio Uruguai (REITZ, 1983). Das espécies citadas, 31 são endêmicas sendo portanto, um grupo taxonômico de alta riqueza em diversidade genérica e específica (MARTINELLI et al., 2008). Porém, em função de seus efeitos ornamentais e paisagísticos, elas têm sido extraídas desordenadamente de seus habitats naturais e comercializadas em todo o país (COFFANI NUNES, 2002). E, como decorrência do progressivo processo de devastação de seu bioma, muitas destas espécies estão ameaçadas de extinção (BRASIL-MMA, 2008).

A propagação vegetativa das bromélias na natureza é lenta, devido ao baixo número de brotos laterais produzidos pelas plantas após o florescimento (MERCIER & KERBAUY, 1995; CARNEIRO et al., 1999). Por outro lado, o uso de sementes também não supre as necessidades de propagação dessas plantas, pois as taxas de germinação no ambiente natural, em geral, são baixas (MERCIER & KERBAUY, 1995), e o estágio juvenil da planta é bastante longo (HOSOKI & ASAHIRA, 1980).

O estudo do processo de germinação em bromélias é importante com vistas a ampliar a compreensão das estratégias reprodutivas e possibilitar sua conservação uma vez que a germinação e o estabelecimento das plântulas são estádios críticos no ciclo de vida das plantas. Porém, segundo Mercier & Guerreiro Filho (1990), o processo de germinação de sementes de bromélias é um aspecto pouco estudado. Poucas são as informações morfológicas acerca das sementes e do

desenvolvimento pós-seminal (SCATENA et al., 2006), uma vez que estas estruturas são descritas com pouco detalhamento (RAUH & GROSS, 1991). Deve-se ressaltar, no entanto, que o estudo da anatomia das sementes durante a germinação e o desenvolvimento pós-seminal é tão importante quanto à morfologia, pois fornece informações sobre as modificações que ocorrem nos tecidos vegetais nesse momento.

O cultivo *in vitro* de sementes pode ser considerado uma técnica importante, visto que a emergência da planta ocorre em um menor tempo, quando comparado ao processo natural, além de um número muito maior de sementes germinarem (MERCIER & KERBAUY, 1995). As sementes podem ser retiradas das matas com baixo impacto ambiental (HARTMANN et al., 2002) além de permitir a manutenção da base genética da população original (ARANDA-PERES & RODRIGUEZ, 2006). Portanto, as plantas podem ser reintroduzidas na mata, assegurando a diversidade das espécies (ARANDA-PERES, 2005). Adicionalmente, as plântulas produzidas a partir da germinação *in vitro* podem funcionar como matriz na micropropagação ou podem também prover de explantes para o estudo da morfogênese vegetal.

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta que tem sido utilizada nos últimos anos na conservação de espécies ameaçadas (SARASAN et al., 2006) tanto na propagação clonal por explantes (vegetativa) como na germinação de sementes (FAY, 1994; SARASAN et al., 2006). Esta técnica oferece várias vantagens, como grande número de plantas em curto período de tempo, além de plantas livres de vírus e bactérias (MERCIER & NIEVOLA, 2003).

A propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação é uma técnica utilizada por diversos países em escala comercial com intuito de acelerar os métodos convencionais de propagação de espécies de interesse comercial, como as plantas ornamentais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Vários estudos neste sentido foram realizados com várias espécies de bromélias (ALVES et al., 2006; DAL VESCO, 2010; DAL VESCO e GUERRA, 2010; PING-LUNG, 2010; KURITA, 2011). Um padrão de resposta da morfogênese *in vitro*, observado em bromeliáceas foi definido como culturas nodulares (CN), as quais apresentam alto potencial regenerativo, culminando na produção múltipla de brotos adventícios em condições de cultura adequada (GUERRA & DAL VESCO, 2010). Uma das estratégias para a indução de CN em bromélias se baseia no uso de bases foliares (ALVES et al., 2006; RECH FILHO et al., 2009; DAL VESCO, 2010) e no uso de sementes (DAL VESCO, 2010). Assim, DAL VESCO (2010) descreveu um modelo regenerativo baseado nas CN que se configura em uma

estratégia eficiente para a micropropagação em grande escala de bromélias que apresentem potencial ornamental e/ou se encontrem ameaçadas de extinção.

Diante do exposto, a propagação por meio da cultura de tecidos apresenta muitas vantagens, proporcionando o desenvolvimento de protocolos para a conservação do germoplasma e para a micropropagação massal que podem ser utilizados em escala comercial, diminuindo a pressão de extração destas espécies do seu habitat natural. Assim, considerando a importância das Bromeliaceae no cenário nacional, bem como da conservação da biodiversidade se faz necessário continuar com os estudos do desenvolvimento das bromélias sob as condições *in vitro* e do processo germinativo e de estabelecimento de plântulas, a fim de aportar informação para o aprimoramento de protocolos de propagação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho objetivou avaliar os aspectos morfológicos e histoquímicos da germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal em *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, assim como a formação de culturas nodulares em *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* e *Vriesea reitzii*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a germinação *in vitro* das sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* mediante a determinação da porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação.
- Caracterizar a morfologia e histoquímica das sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa*.
- Descrever morfológicamente e mediante técnicas histoquímicas os procesos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de *V. friburgensis* var. *paludosa*.
- Identificar as reservas nas sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* e caracterizar histoquimicamente sua mobilização

durante o processo de germinação e desenvolvimento pós-seminal.

- Induzir culturas nodulares a partir de sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* em meio de cultura com diferentes combinações dos reguladores de crescimento: Ácido α -naftalenoacético, 2-isopenteniladenina e 6-benzilaminopurina.
- Caracterizar os aspectos morfológicos e histoquímicos durante a formação das culturas nodulares a partir de sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* e explantes foliares de *Vriesea reitzii*.

Os resultados referentes aos objetivos propostos encontram-se nos capítulos apresentados nesta dissertação.

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P.

Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Hort.** 110: 204–207, 2006.

ARANDA-PERES, A. N. **Cultivo *in vitro* de bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, avaliação nutricional e substrato para aclimatação.** Tese, Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. Bromeliads. In.: Silva, J.A.T. da. (org.). **Floriculture, ornam. plant biotech.**, 1ª Ed. London, UK: Global Science Books. 4: 644-655, 2006.

BENNETT, B. C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZING, D. H. (Ed.). **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation.** London: Cambridge University Press, 2000.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation.** New York: Cambridge University Press, p. 690, 2000.

BRASIL-MMA - Ministro de Estado do Meio Ambiente. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Instrução Normativa nº. 6 de 23 de setembro de 2008. DOU 24.09.2008.

CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G. J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J. & MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 55: 79-83, 1999.

COFFANI NUNES J. V. Bromélias. In: Simões LL and Lino CF (eds), **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**. São Paulo, SENAC, p. 119-132, 2002.

DAL VESCO, L. L. **Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da mata atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): bases para a conservação e propagação massal**. Tese Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. **Scientia Hort.** 125: 748-755, 2010.

FAY, M.F. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? **Biodiversity and Conservation** 3: 176-183, 1994.

FIALHO, R. F.; FURTADO, A. L. S. Germination of *Erythroxylum ovalifolium* (Erythroxylaceae) seeds within the terrestrial bromeliad *Neoregelia cruenta*. **Biotropica** 25: 359-362, 1993.

GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, p. 99-169, 1998.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, 589: 47-66, 2010.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation**. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HAY, J. D. & LACERDA, L. D. Alterações nas características do solo após fixação de *Neoregelia cruenta* (R. Grah.) L. B. Smith (Bromeliaceae) em um ecossistema de restinga. **Ciência & Cultura**, 32 (7): 863- 867, 1980.

HOSOKI, T. & ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience**, 15(5): 603-604, 1980.

KURITA, F. M. K. **Crescimento in vitro da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio**. Dissertação Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo. 2011.

LUTHER, H.E. **An alphabetic list of Bromeliad Binomials**. The Marie Selby Botanical Gardens. 11a Ed. Sarasota, Florida: Bromeliad Society International, 114p, 2008.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; FERREIRA DA COSTA, A.; FORZZA, R.C. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, 59(1): 209-258, 2008.

MERCIER, H.; GUERREIRO FILHO, O. Sexual propagation of some native bromeliads of Mata Atlântica: effect of light and temperature on germination. **Hoehnea**, 17: 19-26, 1990.

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

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

METZGER, J. P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. **Biol. Conserv.** 142: 1138-1140, 2009.

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

NEGRELLE, R. R. B.; MITCHELL, D.; ANACLETO, A. Local production and global markets: lessons from southern Br Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Maringá**, 34(1): 91-100, 2012.

PADILHA, V. Bromeliads: New York, Crow Publishers Inc, 134p, 1978.

PING-LUNG, H.; ZIN-HUANG, L.; LI-JEN L.; CHI-CHU, T. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 105: 73-78, 2010. Doi: 10.1007/s11240-010-9843-0.

RAUH, W. & E. GROSS. Bromelienstudien 22. Trop. Subtrop. Pflanz. 79: 12-14, 1991.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**. (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues, 559p, 1983.

ROCHA, C. F. D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; ALMEIDA, D. R.; FREITAS, A. F. N. Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. **Bromélia** 4(4): 7-11, 1997.

SARASAN, V., CRIPPS, R., RAMSAY, M.M., ATHERTON, C., MCMICHEN, M., PREDERGAST, G. & ROWNTREE, J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 42: 206-214, 2006.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S.; COAN, A. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia L.* (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49 (6): 945-951, 2006.

SILVA, J. M. C., TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. **Nature**, 404: 72–74, 2000.

WANDERLEY, M.G.L. & MARTINS, S.E. Bromeliaceae. In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S. & Giulietti, A.M. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 5: 39-155, 2007.

2 CAPÍTULO I: MORFOLOGIA DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E O DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL DA BROMÉLIA *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith

RESUMO

A germinação *in vitro* de sementes é considerada uma técnica importante na conservação das bromélias ameaçadas. Assim mesmo, o estudo da germinação é fundamental para a compreensão do estabelecimento de uma comunidade vegetal. Portanto, objetivou-se avaliar a germinação *in vitro*, e caracterizar a morfologia das sementes e os processos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de *V. friburgensis* var. *paludosa*. Foram coletadas sementes de frutos maduros que estavam iniciando sua abertura, e posteriormente foram desinfestadas e inoculadas em meio de cultura MS isento de reguladores de crescimento. Os resultados mostram porcentagem de germinação de 97,7 + 1,2 %, peso de mil sementes de 683,8 mg, e um IVG de 21,43. As sementes são fusiformes, com tegumento de cor castanho e apêndices plumosos esbranquiçados. Medem 4,4 mm de comprimento e 0,5 mm de largura. Apresentam um embrião basal que ocupa cerca de 1/3 da semente. A germinação é do tipo epígea criptocotiledonar. Observou-se a germinação no dia 3º após a inoculação no meio. No dia 12º iniciou-se a emergência do primeiro eofilo e no dia 18º do segundo eofilo. Na semana 4, surgiu a terceira folha, as plantas jovens apresentaram o formato de roseta, e iniciou-se a formação de raízes adventícias. *V. friburgensis* var. *paludosa* apresentou o padrão de desenvolvimento pós-seminal semelhante a outras bromélias do gênero *Vriesea*. A sua germinação *in vitro* foi uniforme, rápida e com alta porcentagem, indicando uma alta qualidade fisiológica das sementes e consequentemente, alto potencial para a produção de mudas. As informações obtidas podem auxiliar na identificação de estruturas essenciais na germinação e no diagnóstico de plântulas normais e também constituem ferramentas úteis para estudos biológicos, taxonômicos, ecológicos e de tecnologia de sementes.

Palavras-chave: bainha cotiledonar, cotilédone haustorial, embrião, eofilo, plântula, semente.

ABSTRACT

The *in vitro* germination of seeds is considered an important technique in the conservation of endangered bromeliads. Likewise, the study of

germination is essential for understanding the establishment of a plant community. Therefore, the objective was to evaluate the *in vitro* germination, and to characterize the morphology of seed, germination and post-seminal development of *V. friburgensis* var. *paludosa*. Were collected seeds from mature fruits that were beginning their opening, and were sterilized and inoculated in MS culture medium free of growth regulators. The results show the percentage of germination of 97.7%, thousand seed weights of 683.8 mg and speed germination index of 21.43. The seeds are fusiform, with brown seed coat and whitish feathery appendages. Measured 4.4mm length and 0.5mm wide. Have a basal embryo which occupies about one third of the seed. Germination is epigeous cryptocotyledonary. On the third day after inoculation in the medium, it was observed the germination. In the twelfth day, it was observed the emergence of the first eophyll and in the eighth day the second eophyll. At week 4, the third leaf emerged, the seedlings showed the shape of rosettes, and initiated the formation of adventitious roots. *V. friburgensis* var. *paludosa* showed the pattern of post-seminal development similar to other genus *Vriesea* bromeliads. The *in vitro* germination was uniform, rapid and a high percentage, indicating a high physiological seed quality and therefore high potential for seedling production. The information obtained can assist in identifying key structures on germination and normal seedlings and diagnostic tools are also useful for biological, taxonomic, ecological and seed technology studies.

Keywords: cotyledonary sheath, haustorial cotyledon, embryo, eophyll, seedling, seed

2.1 INTRODUÇÃO

Entre as espécies de Bromeliáceas da Mata Atlântica Brasileira se encontra a *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith. Esta bromélia pertence à subfamília Tillandsioideae e ocorre nas restingas do estado de Santa Catarina (FALKENBERG, 1999). É uma bromélia-tanque, que se desenvolve, preferencialmente, como terrícola, formando densos agrupamentos, mas pode ocorrer em rochas e sobre outras plantas (REITZ, 1983). Atualmente, devido ao apelo ornamental, os exemplares são extraídos da restinga de forma ilegal, comprometendo a manutenção da espécie no ecossistema natural (Fig. 1a-c). Adicionalmente a fragmentação de seu ambiente natural contribui com a diminuição das populações e, conseqüentemente, aumenta o perigo de extinção desta espécie (SOUZA, 2004).

A germinação *in vitro* de sementes pode ser considerada uma técnica de grande importância na conservação de germoplasma de bromélias ameaçadas, visto que a emergência da planta ocorre em um tempo mais reduzido, quando comparado ao processo natural, além de um número muito maior de sementes germinarem (MERCIER & KERBAUY, 1995). Tem-se obtido elevadas taxas de germinação *in vitro* de sementes de bromélias com o emprego do meio de cultura de Knudson ou Murashige & Skoog (BELLINTANI et al., 2007; DROSTE et al., 2005; RECH FILHO, 2004; Dal Vesco, 2010).

O estudo da germinação de sementes é de fundamental importância tanto para a compreensão do estabelecimento de uma comunidade vegetal como para a sobrevivência e regeneração natural das espécies (FENNER & THOMPSON 2005). O objetivo principal dos organismos é produzir gerações bem-sucedidas, portanto os estádios iniciais de uma planta são extremamente importantes para o seu sucesso reprodutivo (RICKLEFS, 2003). Durante o processo germinativo e o estabelecimento de plântulas, o conhecimento morfológico pode auxiliar na interpretação correta dos testes de germinação (SCATENA et al., 2006), na conservação de sementes (ANDRADE et al., 2003), na diferenciação de grupos taxonômicos, na circunscrição infragenérica e infrafamiliar (PEREIRA, 1988; TILLICH, 1995, 2000, 2007; STREHL & BEHEREGARAY 2006; SCATENA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008), na contribuição em estudos sobre regeneração de ecossistemas naturais (Melo & Varela, 2006), e em programas de produção de mudas (PEREIRA et al., 2008) uma vez que a germinação e o estabelecimento das plântulas são estádios críticos no ciclo de vida das plantas (MELO et al., 2004). Diante o exposto, objetivou-se no presente trabalho, avaliar a germinação *in vitro*, assim como caracterizar a morfologia das sementes e dos procesos de germinação e desenvolvimento pós-seminal de *V. friburgensis* var. *paludosa*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 semente

Foram coletados frutos maduros que estavam iniciando sua abertura, de plantas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas na coleção de bromélias do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina. Os mesmos foram levados para o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal (LFDGV) para a extração das sementes e posteriores análises.

2.2.2 Condições de germinação *in vitro*

Os apêndices plumosos das sementes foram cortados para facilitar o processo de desinfestação e na sequência os explantes foram imersos durante 2 min em álcool (70%), 25 min em solução de água sanitária comercial (1% de cloro ativo) com uma gota de Tween 20 em cada 100 ml de solução e três enxágues consecutivos com água destilada estéril, segundo os procedimentos descritos por Guerra e Dal Vesco (2010).

Após o processo de desinfestação foram inoculadas 4 sementes por tubo de ensaio (22x150 mm), contendo 15 ml de meio de cultura geleificado, constituído pela formulação de nutrientes minerais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), adicionado de vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951) e sacarose (30g L⁻¹), doravante denominado de meio MS básico (MSB). Ao MSB foi adicionado 7,5g L⁻¹ de Agar-agar (Sigma®) e o pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 antes da autoclavagem por 15 min a 121 °C e 1,3 atm de pressão. Após a inoculação o material vegetal foi mantido em sala de cultura com temperatura de 25 °C ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 50-60 μmol m⁻² s⁻¹.

2.2.3 Análise morfométrica da semente

Na descrição biométrica das sementes (comprimento e largura) foram escolhidas ao acaso 50 sementes de cinco indivíduos diferentes, as quais foram medidas individualmente com paquímetro (SILVA e SCATENA, 2011). O comprimento e a largura delas foram representados pela média (± desvio padrão) dos dados.

O peso de mil sementes foi realizado utilizando-se balança de precisão (0,1 mg), segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil 2009). A fórmula utilizada foi:

$$\text{Peso de mil sementes} = \frac{\text{Peso da amostra} \times 1000}{\text{N}^\circ \text{ total de sementes}}$$

Na observação da morfologia interna, as sementes foram submetidas á solução de tetrazólio para a observação dos tecidos viáveis. Previamente elas foram embebidas em água destilada durante 24 horas. Depois foram seccionadas longitudinalmente, imersas em 1% da solução de tetrazólio e mantidas na ausência de luz durante 4 horas.

2.2.4 Avaliação da germinação *in vitro*

Para as avaliações foram empregadas três réplicas de 30 sementes, obtidas de frutos ao acaso. As sementes foram desinfestadas e inoculadas no meio MSB como foi indicado previamente (item 2.2.2.). O ensaio teve duração de 15 dias, sendo que a avaliação da germinação foi realizada diariamente, de modo que ao final do teste, foi avaliada a porcentagem de germinação e verificado o índice de velocidade de germinação (IVG), empregando-se a fórmula proposta por Maguire (1962):

$IVG = \Sigma (Gi/ni)$ onde,

Gi = número de sementes germinadas e ni = dia da contagem.

Consideraram-se como sementes germinadas aquelas em que uma das partes do embrião rompeu do envoltório seminal, acompanhada de algum sinal de metabolismo ativo (LABORIAU, 1983).

2.2.5 Morfologia da germinação *in vitro* e o desenvolvimento pós-seminal

Após a inoculação no meio de cultura MSB, procedeu-se com avaliações diárias, visando o acompanhamento da germinação e do desenvolvimento pós-seminal até o estágio de plântula. A terminologia adotada na descrição das plântulas baseou-se em Pereira (1988) e em Tillich (2007). O registro fotográfico foi realizado com o auxílio do microscópio estereoscópico (Olympus SZH-ILLB), equipado com câmara clara (Olympus DP71).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análise morfológica da semente

Vriesea friburgensis var. *paludosa* apresenta sementes pequenas, fusiformes, com tegumento de cor castanho, com cerca de 4,4 mm de comprimento e 0,5 mm de largura e um peso de mil sementes de 683,8 mg (Tabela 1). As sementes apresentam apêndices plumosos esbranquiçados, ligados através de todo o tegumento, com a maior extensão no extremo micropilar (Fig. 1d,e). Os resultados obtidos são similares às características morfológicas das sementes encontradas em outras espécies deste gênero. *Vriesea heterostachys* (Baker) L. B. Smith

apresentam as sementes pequenas, filiformes, medem aproximadamente 6,3 mm de comprimento e 1,0 mm de largura, aladas, com apêndices plumosos esbranquiçados presentes apenas em uma das extremidades da semente e com tegumento castanho amarronzado (PEREIRA et al., 2008). *Vriesea bituminosa* apresentam sementes fusiformes, com cerca de 4,45 mm de comprimento, 0,35 mm de largura e testa com apêndices plumosos (OLIVEIRA, 2010). Segundo Benzing (2000) e Scatena et al. (2006), a presença de estruturas aladas, como os apêndices plumosos, facilitam a dispersão das sementes por grandes distâncias e permitem que as mesmas alcancem e se estabeleçam em microambientes inóspitos. Este tipo de apêndices já foram encontrados em sementes de outras bromélias representantes da subfamília Tillandsioideae, como *Tillandsia gardneri* Lindl., *Tillandsia streptocarpa* Baker, *Tillandsia stricta* Sol. (SCATENA et al., 2006), *Vriesea heterostachys* (Baker) L.B. Sm, *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (PEREIRA et al., 2008), *Vriesea penduliflora* L. B. Sm. (PEREIRA et al., 2009) e *Tillandsia adpressiflora* Mez (SILVA e SCATENA, 2011). As sementes de algumas espécies da subfamília Bromelioideae apresentaram mucilagem, na subfamília Pitcairnioidae apresentam alas membranáceas e na subfamília Tillandsioideae as sementes apresentam apêndices plumosos (PEREIRA 1988; PEREIRA et al. 2008; SILVA e SCATENA, 2011), confirmando-se como caracteres de importância intrafamiliar.

Tabela 1. Dimensões médias, peso, percentual e velocidade de germinação (IVG) das sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

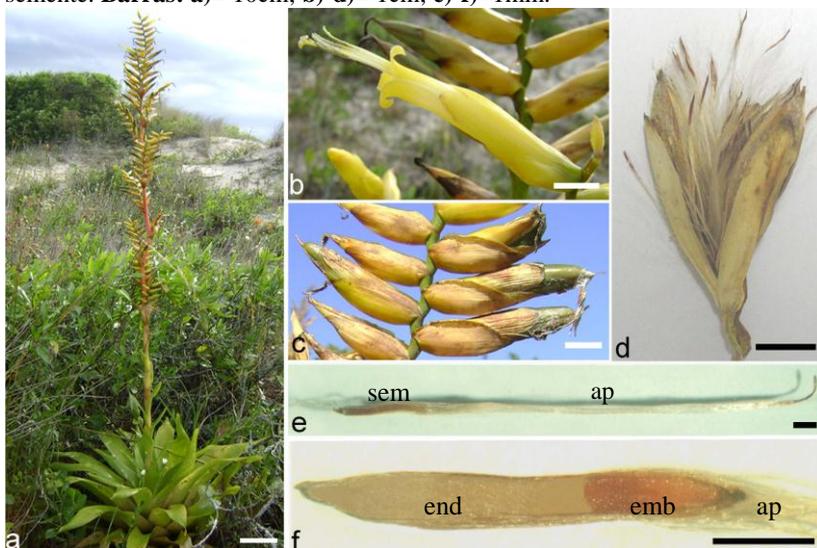
Variáveis	Médias
Comprimento	4,4 ± 0,06 mm
Largura	0,5 ± 0,01 mm
Peso de 1000 sementes	683,8 mg
Germinação	97,7 ± 1,2 %
IVG	21,43

Médias seguidas por desvio padrão (±).

Seções longitudinais de sementes maduras de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas á solução de tetrazólio revelaram estruturas internas com tecido viável, pela coloração avermelhada na região do embrião e tecido não viável, no endosperma, o qual não apresentou coloração (Fig. 1f). Conforme França Neto et al., (1999), o teste de tetrazólio se baseia na atividade das enzimas desidrogenases, particularmente a desidrogenase do ácido málico que reduz o sal de

tetrazólio nos tecidos vivos das sementes, onde íons de H^+ são transferidos para o referido sal. Esta reação de redução nas células vivas resulta na formação de um composto vermelho, indicando haver atividade respiratória nas mitocôndrias e, conseqüentemente, que o tecido é viável. Tecidos não viáveis, não reagem com a solução, conservando a sua cor natural (Delouche et al., 1976).

Figura 1. Aspectos morfológicos da *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* no estado reprodutivo. **a)** Planta em campo; **b)** Detalhe da Flor; **c)** Detalhe do fruto maduro; **d)** Frutos abertos expondo as sementes; **e)** Semente madura com seus apêndices plumosos; **f)** Corte longitudinal da semente submetida ao tetrazólio, evidenciando estruturas internas: endosperma (tecido não viável) e o embrião (tecido viável). ap: apêndice plumoso; emb: embrião; end: endosperma; sem: semente. **Barras:** **a)**= 10cm; **b)-d)**= 1cm; **e)-f)**=1mm.



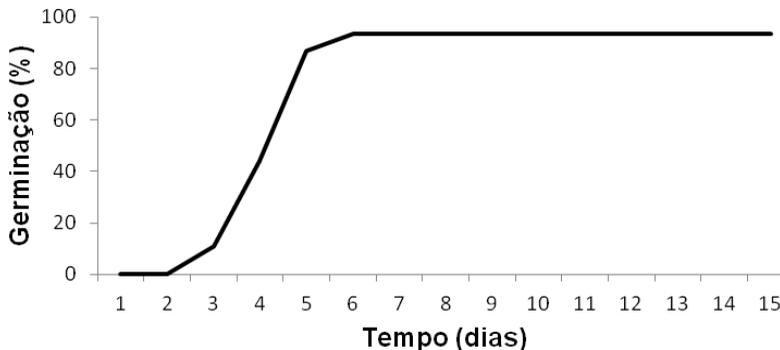
A presença do endosperma indica o tipo de sementes albuminosas, normalmente encontradas em espécies monocotiledôneas (ESAU, 1972; WERKER, 1997). Segundo Bewley & Black (1994) nas monocotiledôneas como os cereais, a maioria das células do endosperma maduro não estão vivas, e o conteúdo citoplasmático tem sido substituído pelas reservas armazenadas durante o desenvolvimento. Porém, a proporção entre endosperma e embrião é um caráter divergente (REEDER, 1957). Por exemplo, nas sementes de *Olyra humilis* (Poaceae-Bambusoideae) a proporção do embrião em relação ao endosperma é de 1:10 (NAKAMURA e SCATENA, 2009). No presente

trabalho, observou-se o tegumento envolvendo o endosperma e um pequeno embrião basal que ocupa cerca de 1/3 da semente (Fig. 1f). De acordo com a classificação de sementes de Angiospermas de Martin (1946), *V. friburgensis* var. *paludosa* apresenta sementes do tipo um quarto, pois o embrião ocupa mais de um quarto e menos da metade da semente.

2.3.2 Avaliação da germinação *in vitro*

A germinação da *V. friburgensis* var. *paludosa* ocorreu após o terceiro dia da inoculação, e no quinto dia foram observadas mais de 80% de sementes germinadas (Fig. 2). A porcentagem média de germinação foi de 97,7% e um IVG de 21,43. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Menescal (1994) e Miranda (1998) quando afirmam que as bromeliáceas são facilmente propagadas por sementes, atingindo um percentual de 100% na germinação. Estes resultados são similares aos encontrados na literatura sobre a germinação *in vitro* de outras espécies do gênero *Vriesea* (Mekers, 1977; Mercier & Kerbauy, 1994). Em *V. brusquensis* a germinação foi de 88,8% (RECH FILHO, 2004), em *V. philippocoburgii*, as taxas de germinação *in vitro* foram de 89% (DROSTE et al. 2005), em *V. gigantea* 100% (BENCKE & DROSTE, 2008) e para *V. reitzii* 79,6% (DAL VESCO, 2010).

Figura 2. Percentual de germinação *in vitro* e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* durante 15 dias de cultivo.



Souza (2004) realizou testes de germinação de *V. friburgensis* var. *paludosa* em papel filtro, mantidas sob temperatura e luminosidade

ambiente e encontrou taxas de 47% em sementes germinadas obtidas por polinização natural e 84,99% obtidas por polinização controlada e cruzada. Por sua vez, Aranda-Franco et al (2003), obtiveram 42,6% de germinação *in vitro* de *V. friburgensis*, inoculadas em meio de cultura ¼ MS acrescido com 10 mL de água de coco e 60 g/L de extrato de banana. Quando o meio foi suplementado com 10 µm de GA₃ eles obtiveram um aumento na germinação (48%). Porém, os percentuais obtidos por estes autores foram menores aos encontrados no presente trabalho (97,7%), indicando que a germinação desta espécie é favorecida pelo uso de técnicas *in vitro*, em meio de cultura MS isento de reguladores de crescimento.

É possível que além do meio de cultura e os fatores relacionados às condições *in vitro*, como por exemplo o processo de desinfestação, tenha auxiliado na remoção de substâncias inibidoras do crescimento associadas ao tegumento. Estas substâncias podem ser moléculas orgânicas relativamente simples e de baixo peso molecular, como aldeídos, ácidos fenólicos, alcalóides e ácidos orgânicos (KETRING, 1973). Segundo Franco & Ferreira (2002), tais substâncias podem ser removidas por lavagens em água destilada e álcool (1:1), aumentando a germinação das sementes *in vitro*. Pompelli (2006), com sementes de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Bromeliaceae-Pitcairnioideae), imersas em ácido sulfúrico a 30%, encontrou uma média de germinação de 72,2%. Segundo o autor, o tratamento químico diminui a pressão do tegumento sobre o embrião com efeitos positivos sobre a germinação das sementes.

No presente trabalho, foi observado o maior número de sementes germinadas no 3º e 4º dia após a inoculação no meio de cultura. Assim, de acordo com Pereira et al. (2008), pode-se considerar a classificação das mesmas como rápidas. Segundo estes autores, no tempo médio de germinação menor que 7 dias são consideradas sementes rápidas e, com tempo médio entre 7 e 14 dias são consideradas intermediárias enquanto que tempo médio maior que 14 dias são lentas. Nos testes de germinação de *V. friburgensis* var. *paludosa* realizados por Souza (2004), em papel filtro mantidas sob temperatura e luminosidade ambiente, as sementes levaram em média $6,8 \pm 1,92$ dias para germinar. Por tanto, nessas condições as sementes também são consideradas rápidas para iniciar a germinação. Porém, em condições *in vitro*, a germinação acontece em tempo menor, corroborando a vantagem desta técnica de cultivo. Segundo vários autores, durante o processo de germinação, o controle da temperatura afeta a velocidade de absorção de água pelas sementes e pode alterar, entre outros aspectos, a porcentagem

total, a velocidade e a uniformidade de germinação (BEWLEY e BLACK, 1994; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; CASTRO et al., 2004).

2.3.3 Morfologia da germinação *in vitro* e o desenvolvimento pós-seminal

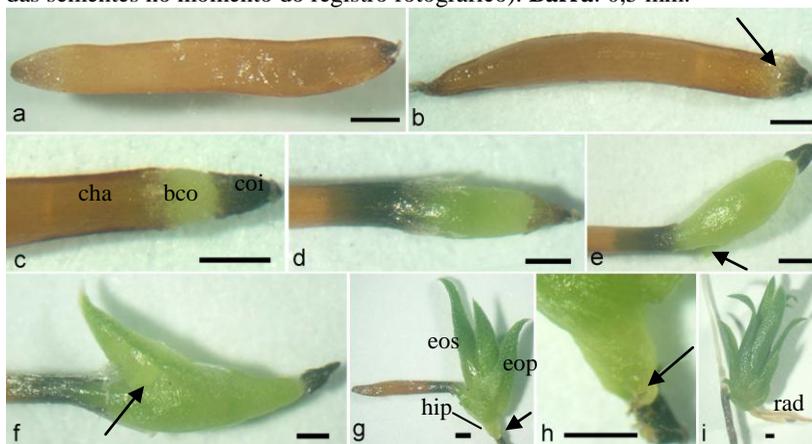
Na Figura 3 apresenta-se um registro fotográfico da germinação *in vitro* e o desenvolvimento pós-seminal das sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* desde antes da inoculação no meio de cultura (Fig. 3a) até a formação da planta jovem com suas primeiras raízes adventícias. No dia 2, após a inoculação no meio de cultura, as sementes *V. friburgensis* apresentaram-se intumescidas devido ao processo de embebição (Fig. 3b). De acordo com Castro et al. (2004), a embebição inicia com a fase de absorção de água, seguida pela fase de preparação e ativação do metabolismo na semente, onde são ativados os processos requeridos para o crescimento do embrião, como a respiração, síntese e duplicação de DNA, início da degradação de reservas e alongamento das células da radícula.

De acordo com o critério fisiológico, a germinação é completa quando uma parte do embrião, em geral a radícula, penetra e transpassa os tecidos que o envolvem (KERBAUY, 2008). Desta maneira a germinação da espécie em estudo culminou no terceiro dia, com a emergência da bainha cotiledonar e o ápice radicular protegido pela coifa. A porção cotiledonar haustorial que não emerge é visível por transparência no interior dos restos seminais (Fig. 3c). A germinação marcada pela emergência da bainha cotiledonar é o mesmo padrão de desenvolvimento pós-seminal verificado em outras espécies do gênero *Vriesea* (PEREIRA et al. 2008, 2009), e em outros gêneros da subfamília Tillandsioideae (SCATENA et al 2006; ALFAYA, 2010; SILVA E SCATENA, 2011). No desenvolvimento pós-seminal em algumas espécies da subfamília Bromelioideae e Pitcairnioideae, observou-se que a primeira estrutura que emerge na germinação é a raiz primária (PEREIRA 1988; SILVA e SCATENA, 2011). Portanto, assim como é sugerido por Silva e Scatena (2011), a morfologia da germinação pode ser uma característica útil nas análises cladísticas da família.

Após oito dias de inoculação no meio de cultura, observa-se a extensão das estruturas emergidas (Fig. 3d) e no dia doze inicia a emissão do primeiro eofilo (forma foliar juvenil) através de uma fenda nos tecidos da bainha cotiledonar (Fig. 3e). Já o eofilo secundário inicia

sua emissão após cerca de 18 dias, enquanto o primeiro eofilo tem uma maior longitude (Fig. e,f). Mantovani e Iglesias (2005) verificaram que o início da emissão da primeira folha nas bromélias *Aechmea nudicaulis*, *Neoregelia cruenta* e *Vriesea neoglutinosa* ocorreu nos dias 11^o, 14^o e 18^o, respectivamente, germinadas em papel filtro umedecido.

Figura 3. Germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*. **a)** Dia 0: Semente antes da inoculação no meio de cultura; **b)** Dia 2: Região do embrião intumescido pela embebição (seta); **c)** Dia 4: Germinação da semente, visíveis a bainha cotiledonar e o ápice radicular protegido pela coifa; **d)** Dia 8: Extensão das estruturas emergidas; **e)** Dia 12: Emergência do primeiro eofilo (seta); **f)** Dia 18: Inicia a emergência do segundo eofilo (seta); **g)** Semana 4: Planta jovem apresentando formato de roseta. Observa-se o hipocótilo reduzido e o início da formação de raízes adventícias (seta); **h)** Detalhe da formação de raiz (seta); **i)** Semana 11: Planta jovem com raízes adventícias desenvolvidas. **bco:** bainha cotiledonar; **cha:** cotilédone haustorial; **coi:** coifa; **eop:** eofilo primário; **eos;** eofilo secundário; **hip:** hipocótilo; **rad:** raiz adventícia (Os apêndices plumosos foram retirados das sementes no momento do registro fotográfico). **Barra:** 0,5 mm.



De acordo com Silva e Scatena (2011), a expansão total do primeiro eofilo e o aparecimento do segundo eofilo é o critério para o estágio de plântula. Assim mesmo, a planta jovem é considerada com a expansão total do segundo eofilo e o aparecimento do terceiro. No presente trabalho, na semana 4, com o surgimento da terceira folha as plantas jovens de *V. friburgensis* var. *paludosa* apresentaram o formato de roseta, peculiar na família Bromeliácea. Observou-se o hipocótilo reduzido, e em algumas plântulas iniciou-se a formação de raízes

adventícias (Fig. 3g-h). Na semana 11, observaram-se plantas com as raízes adventícias desenvolvidas (Fig. 3i). Benzing (2000) afirma que nos membros da subfamília Tillandsioideae, como espécies do gênero *Vriesea*, as raízes das plântulas oriundas de sementes só aparecem semanas a meses após a saída da primeira folha.

Durante a germinação da espécie em estudo foi observado que o cotilédone não se desprende do tegumento da semente, mantendo sua função haustorial, originando plântulas criptocotiledonares (Fig. 3). De acordo com Tillich (1995), o cotilédone haustorial adquiriu as funções de absorção e condução de reservas alimentares a partir do endosperma para a plântula. Tillich (2007) afirma que o termo criptocotiledonar se aplica fortemente às plântulas das Poales (Monocotiledoneae), pois o cotilédone é parte foliáceo, emergindo dos restos seminais através da liberação da bainha cotiledonar; parte haustorial, permanecendo no interior dos tegumentos e mantendo contato com o tecido de reserva.

Observou-se em *V. friburgensis* var. *paludosa*, o padrão de desenvolvimento pós-seminal apresentado por Smith e Downs (1974) para as Bromeliáceas. Estes autores relatam que a germinação ocorre com o alongamento da porção inferior do cotilédone que empurra a radícula para fora da semente, a plúmula permanece envolta por uma bainha cotiledonar, enquanto que a porção superior do cotilédone permanece internamente na semente absorvendo as reservas do endosperma, mantendo a semente unida à plântula por certo tempo.

O tipo de plântula observado para a espécie em estudo corrobora o indicado por Tillich (1995), cujo autor classificou as plântulas Tillandsioideae como desprovidas de raiz primária, que apresentam um cotilédone compacto formado por uma bainha curta e um cotilédone haustorial. Este autor sugere que a presença de raiz primária em monocotiledôneas é provavelmente uma condição ancestral para o grupo, e portanto, a ausência completa de raiz primária em plântulas seria um dos últimos passos evolutivos em monocotiledôneas (TILLICH 2000; 2007). Entretanto, em alguns trabalhos com Bromeliaceae, foi observada sua presença em representantes da subfamília Bromelioideae (PEREIRA 1988; PEREIRA et al. 2008; SILVA e SCATENA, 2011) e sua ausência em representantes da subfamília Tillandsioideae (TILLICH 1995; SCATENA et al. 2006; SILVA e SCATENA, 2011). A ausência da raiz nesta etapa da planta também pode estar relacionada com as características que esta estrutura apresenta nas espécies de bromélias formadoras de tanque, sendo que sua importância tem sido atribuída à função de fixar a bromélia, tendo pouca ou nenhuma contribuição na aquisição de nutrientes. Portanto, as bromélias formadoras de tanque

seriam capazes de adquirir os elementos minerais, preferencialmente por absorção foliar (BENZING 1976, BENZING et al. 1978).

Segundo Sert et al., (2009), quando o(s) cotilédono(s) fica(m) imerso(s) no substrato do solo a germinação é denominada hipógea; se emerge do substrato, a germinação é epígea. Esta última apresentou-se nas sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa*, onde o cotilédono e o tecido de reserva não permanecem abaixo do solo. Este tipo de germinação epígea criptocotiledonar também foi observado em outros representantes de bromeliaceae (PEREIRA, 1988; DUARTE et al., 2009; PEREIRA et al., 2010) e em espécies da subfamília Tillandsioideae, como *Tillandsia adpressiflora* (SILVA e SCATENA, 2011), *Alcantarea imperialis* e *Vriesea heterostachys* (PEREIRA et al., 2008).

2.4 CONCLUSÃO

A germinação *in vitro* uniforme em *V. friburgensis* var. *paludosa* com porcentagem obtida acima de 97%, e a germinação no 3º dia, indicam a alta qualidade fisiológica das sementes e, conseqüentemente, alto potencial para a produção de mudas. Além disto, a não necessidade da suplementação de reguladores de crescimento ao meio de cultura MSB, pode inferir que este tipo de propagação é viável para esta espécie.

Vriesea friburgensis var. *paludosa* apresenta características morfológicas e o padrão de desenvolvimento pós-seminal semelhantes a outras bromélias do gênero *Vriesea* e da subfamília Tillandsioideae. Sementes pequenas e leves com presença de apêndices plumosos que ajudam na dispersão pelo vento, além de desenvolverem rapidamente em plântulas para facilitar sua fixação no substrato, consistem em estratégias desta espécie para o estabelecimento no ecossistema.

As características tais como: sementes albuminosas, embrião com cotilédono haustorial, germinação epígea, plântulas criptocotiledonares, rápido desenvolvimento das plântulas; são informações que além de auxiliarem na identificação de estruturas essenciais na germinação e no diagnóstico de plântulas normais em condições naturais e/ou de cultivo, também constituem ferramentas úteis para estudos biológicos, taxonômicos, ecológicos e de tecnologia de sementes.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFAYA, M. C. F. **Morfologia e germinação de sementes de *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant. (Bromeliaceae).** Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – Bahia, 2010.
- ALVES, G. M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Hort.** 110: 204–207, 2006.
- ANDRADE, A.C.S.; CUNHA, R.; SOUZA, A.F.; REIS, R.B. & ALMEIDA, K.J. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed Science & Technology** 31: 125-137, 2003.
- ARANDA-FRANCO, A. N.; BONASSA, R. C.; RODRIGUEZ, A. P. M. Influência do GA₃ na germinação *in vitro* de cinco espécies de bromélias em perigo de extinção. 43 Congresso Nacional de Olericultura, 2003.
- ARANDA-PERES, A. N. **Cultivo *in vitro* de bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, avaliação nutricional e substrato para aclimação.** Tese, Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005
- BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R.; DORNELLES, A. L.C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, 5: 1101-1103, 2007.
- BENCKE, M.; DROSTE, A. Otimização da micropropagação de *vriesea gigantea* gaudich. (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas, Botânica*, São Leopoldo : Instituto Anchieta de Pesquisas n° 59: 299-306, 2008.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation.** New York: Cambridge University Press, p. 690, 2000.

BENZING, D. H. Germination and early establishment of *Tillandsia circinnata* Schlecht. (Bromeliaceae) on some of its hosts and other supports in south Florida. **Selbyana**, 5: 95-106, 1978.

BENZING, D. H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. **American Journal of Botany**. 63: 1009-1014, 1976.

BEWLEY, J. D.; BLACK M. **Seeds. Physiology of development and germination**. 2nd ed. New York, Plenum Press, 1994.

BRASIL. Ministério da agricultura, Pecuaria e Abastecimento. **Regras para análises de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 365 p, 2009.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p, 2000.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: o Básico ao Aplicado**. ARTMED, Porto Alegre, 324 p, 2004.

DAL VESCO, L. L. **Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da mata atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): bases para a conservação e propagação massal**. Tese Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 103p, 1976.

DROSTE, A.; SILVA, A.M.; MATOS, A.V.; ALMEIDA, J. W. In Vitro Culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two Vulnerable Bromeliads Native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol.48, n. 5 : 717-722, 2005.

DUARTE, E. F.; CARNEIRO, I. F.; REZENDE, M. H. Morfologia de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae). **Rev. Biol. Neotrop.** 6(1):1-12, 2009.

ESAU, K. **Anatomia vegetal**. Barcelona, Ed. Omega S.A, 779 p. 1972.

FALKENBERG, D. B. Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, Sul do Brasil. **Insula** 28, 1-30, 1999.

FENNER, M. & THOMPSON, K. The ecology of seeds. Cambridge University Press, Cambridge. 2005.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (eds). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. 1999.

FRANCO, E. T. H.; FERREIRA, A. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Dydimopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. Et Planch. **Ciência Florestal**, 12 (1): 1-10, 2002.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, 589: 47-66, 2010.

KETRING, A. L. Germination inhibitors. **Seed Science and Technology**, 1 (2): 305-324, 1973.

LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 174 p. 1983.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 2 (2):176-177, 1962.

MANTOVANI, A.; IGLESIAS, R. R. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. **Rodriguésia**. 56 (87): 73-84, 2005.

MARTIN, A. C. The comparative internal morphology of seeds. **The American Midland Naturalist**, 36: 513-660, 1946.

MEKERS, O. *In vitro* propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Acta Horticulturae**, 78: 311-320, 1977.

MELO, F. P. L.; AGUIAR NETO, A. V.; SIMABUKURO, E. A.; TABARELLI, M. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In: A. G. Ferreira,; F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, p. 237-249, 2004.

MELO, M. F. F.; VARELA, V. P. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, germinação e plântulas de duas espécies florestais da Amazônia *Dinizia excelsa* Ducke (Angelim Pedra) e *Cedrelinga catenaeformis* Ducke (Cedrorana) Leguminosae: Mimosoideae. **Revista Brasileira de Sementes** (28): 54-62, 2006.

MENESCAL, R. Reprodução de bromélias por sementes. **Bromélia**, 1(4): 8-10, 1994.

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

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

MIRANDA, A. Em busca da *Aechmea tocutina*. **Bromélia**, 5 (1-4): 47-49, 1998.

MOREL, G. M. & WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **Am. J. Bot.** 38:138-140, 1951.

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

NAKAMURA, A. T.; SCATENA, V. L. Desenvolvimento pós-seminal de espécies de Poaceae (Poales). **Acta Botanica Brasilica** 23: 212-222, 2009.

OLIVEIRA, D. M. Morfologia das sementes de Bromeliaceae ocorrentes no portal da amazônia. Anais 3ª Jornada Científica da UNEMAT, Cáceres/mt, Brasil, UNEMAT, 2010.

PEREIRA, A. R.; ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S.; FORZZA, R. C.; RODRIGUES, A. S. Morphological aspects of seed, germination and storage of *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae). **Seed Sci. & Technol.**, 38: 79-87, 2010.

PEREIRA, A. R.; ANDRADE, A. C.; PEREIRA, T. S.; FORZZA, R. C.; RODRIGUES, A. S. Comportamento germinativo de espécies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, 32(4): 827-838, 2009.

PEREIRA, A. R.; PEREIRA, T. S.; RODRIGUES, A. S. & ANDRADE, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. **Acta Botanica Brasilica** 22: 1150-1162, 2008.

PEREIRA, T. S. Bromelioideae (Bromeliaceae) Morfologia de desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 29: 115-154, 1988.

POMPELLI, M. F. Germinação de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcarirnioideae). **Floresta e Ambiente**, 13 (1): 1-9, 2006.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.

REEDER, J.R. The embryo in grass systematics. **American Journal of Botany**. 44: 756-768, 1957.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**. (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues, 559p, 1983.

RICKLEFS, R. E. A economia da natureza. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 503p, 2003.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S.; COAN, A. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia L.* (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49 (6): 945-951, 2006.

SERT, M. A.; BONATO, C. M.; SOUZA, L. A. Germinação da semente. Em: Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação. SOUZA, L. A. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2009.

SILVA, I. V.; SCATENA, V. L. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. **Rodriguesia**, 62(2): 263-272, 2011.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioidea (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monograph** No. 14, Part . 1. New York: OFN-Halfner Press, 658 p, 1974.

SOUZA, D. A. S. **Ecologia reprodutiva de *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L. B. Smith (Bromeliaceae), em área de restinga, no litoral sul de Santa Catarina, Brasil.** Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.

STREHL, T. & BEHEREGARAY, R.C.P. Morfologia de sementes do gênero *Dyckia*, subfamília Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Pesquisas Botânicas** 57: 103-120, 2006.

TILLICH, H.-J. Ancestral and derived character states in seedlings of monocotyledons. Pp. 221-228. In: Wilson K.L. & Morrison D.A. (eds.). **Monocots: Systematics and evolution.** Melbourne, CSIRO, 2000.

TILLICH, H.-J. Seedling diversity and homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). **Annals of Botany**. 100: 1-17, 2007.

TILLICH, H.-J. Seedlings and systematics in monocotyledons. p. 303-352. In: Rudall P.J.; Cribb P.J.; Cutler D.F. & Humphries C.J. (eds.). **Monocotyledons: systematics and evolution.** Kew, Royal Botanic Gardens, 1995.

WERKER, E. **Seed anatomy.** Berlin, Gebrüder Borntraeger, 1997.

3. CAPÍTULO II: ANÁLISE MORFO-HISTOQUÍMICA DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E DO DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL EM *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith

RESUMO

Tendo em vista que pouco se conhece a respeito das características morfo-histoquímicas nas sementes e nos processos de formação das plântulas de bromélias nativas, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os aspectos morfo-histoquímicos das sementes, da germinação e o desenvolvimento pós-seminal da bromélia *V. friburgensis* var. *paludosa*, assim como identificar as reservas e a sua mobilização durante estes processos. Foram coletadas sementes de frutos maduros que estavam iniciando sua abertura e posteriormente foram desinfestadas e inoculadas em meio de cultura MS isento de reguladores de crescimento. As sementes são bitegumentadas e observou-se no seu tegumento principalmente compostos fenólicos. No citoplasma das células do endosperma observou-se o acúmulo de amido como principal composto de reserva, distribuído em amiloplastos e que junto com as proteínas mostraram uma diminuição gradual durante a formação da plântula. O endosperma está rodeado pela camada de aleurona, com células que apresentam grande quantidade de proteínas e lipídios. Identificou-se também no endosperma uma camada de células empilhadas próximas ao embrião, indicando que também poderia desempenhar um papel na regulação do crescimento embrionário. O embrião apresentou-se pouco diferenciado na semente madura, com alguns grãos de amido e com um cotilédone haustorial com superfície lisa, que além da função de absorver e conduzir as reservas do endosperma para o embrião, possivelmente também esteja relacionado com o fornecimento de enzimas hidrolíticas. As análises morfo-histoquímicas, permitiram caracterizar os distintos tecidos na semente e identificar diferenças na composição química, relacionadas com a sua função durante os processos de germinação e desenvolvimento pós-seminal. Estas informações sugerem estratégias desta espécie para o sucesso no estabelecimento das plântulas, e são importantes para o estudo aplicado à conservação, propagação e ao manejo desta espécie.

Palavras-chave: amido, camada de aleurona, cotilédone haustorial, embrião, endosperma, semente, tegumento.

ABSTRACT

Given that little is known about the morphological and histochemical features in seeds and the formation processes of seedlings of native bromeliads, the objective of this study was to characterize the morphological and histochemical aspects of seed, germination and post-seminal development of bromeliad *V. friburgensis* var. *paludosa*, as well as identifying the reserves and their mobilization during these processes. Were collected seeds from mature fruit that were beginning their opening and subsequently were sterilized and inoculated in MS culture medium free of growth regulators. The seeds are bitegmic and it was observed mainly in its coat phenolic compounds. In the cytoplasm of the endosperm cells observed accumulation of starch as the main reserve compound, distributed amyloplasts and with the proteins showed a gradual decrease during the formation of the seedling. The endosperm is surrounded by the aleurone layer, with cells that have large amounts of proteins and lipids. It was also found in the endosperm cells of a layer stacked close to the embryo, indicating that could also play a role in regulating the growth of the embryo. The embryo is poorly differentiated in mature seed, with a few grains of starch and has a cotyledon haustorial smooth surface, which besides the function of absorbing and conducting the reserve to the growing embryo, possibly also relates to the provision of enzymes hydrolytic. The morpho-histochemical information, allowed to characterize the different tissues in the seed and to identify differences in chemical composition, related to its function during germination and post-seminal development. These data suggest strategies for this species in the successful establishment of seedlings, and are important for the study applied to the conservation, propagation and management of this species. **Keywords:** starch, aleurone layer, haustorial cotyledon, embryo, endosperm, seed coat.

3.1 INTRODUÇÃO

Além da importância ecológica nos ecossistemas, a família Bromeliaceae tem uma importância econômica referida como plantas ornamentais, sendo atualmente muito cultivada e utilizada em decorações de interior e projetos paisagísticos. Em função da grande procura pelas bromélias de valor ornamental, o extrativismo de seus ambientes naturais tem se intensificado nos últimos anos (MOREIRA, 2006). Esta ação predatória, associada à redução e fragmentação da

Floresta Atlântica, sem a reposição natural dos estoques nas florestas, provocou grandes danos ambientais, entre estes a redução da diversidade específica de bromélias e de outras espécies co-existentes (NAHOUM, 1994; LEME, 1998; ANACLETO, 2001).

Nos últimos anos tem se intensificado o interesse na propagação de espécies nativas, devido à ênfase atual nos problemas ambientais, ressaltando a necessidade de recuperação de áreas degradadas e recomposição da paisagem natural. Portanto há necessidade de se obter informações básicas sobre a germinação, o cultivo e as potencialidades dessas espécies nativas, visando sua utilização para os mais diversos fins (POMPELLI, 2006). A germinação envolve eventos anatômicos ou morfológicos, genéticos, metabólicos e hormonais (BORGES e RENA, 1993) e os substratos para essa alteração metabólica rápida são os compostos de reserva armazenados nas sementes (MANSFIELD e BRIARTY, 1996). Assim, as reservas estão relacionadas com a manutenção e desenvolvimento do embrião. Estas podem funcionar como fonte de energia para manter os processos metabólicos e como fonte de matéria para a estruturação de tecidos vegetais que garantirão a formação de uma plântula (KERBAUY, 2004; BUCKERIDGE et al., 2004a).

O conhecimento sobre a germinação da *V. friburgensis* var. *paludosa*, fornece detalhes em relação à rota complexa de desenvolvimento que inicia o ciclo de vida da planta. O uso de análises morfo-anatômicas do material, utilizando técnicas de microscopia ótica e eletrônica, pode ser fundamental para sua interpretação na identificação e caracterização das estruturas. Segundo Buckeridge et al. (2004a), torna-se relevante conhecer aspectos da composição química e da fisiologia das sementes de espécies nativas das florestas tropicais, do Cerrado e de outros biomas. Tais informações são importantes para auxiliar, por exemplo, a produção de mudas de alta qualidade para tentar recuperar áreas que foram degradadas por atividades agrícolas e industriais. A composição química de uma semente também é de interesse prático da tecnologia de sementes, porque tanto o vigor quanto o potencial de armazenamento de sementes são influenciados pelo teor dos compostos de reserva presentes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

A partir do conhecimento dos aspectos morfo-anatômicos e histoquímicos associados à germinação de sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa*, é possível obter informações que auxiliem em estudos de germinação, armazenamento e métodos de cultivo, além de auxiliar

estudos sobre as técnicas *in vitro* para a propagação massal, bem como aprofundar o conhecimento sobre biologia da propagação desta espécie.

Tendo em vista que pouco se conhece a respeito das características morfo-histoquímicas nas sementes e no processo de estabilização de plântulas de bromélias nativas, o objetivo deste capítulo foi caracterizar os aspectos morfo-histoquímicos das sementes, durante a germinação e o desenvolvimento pós-seminal da bromélia *V. friburgensis* var. *paludosa*, assim como identificar as reservas e sua mobilização durante estes processos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Semente

Foram coletados frutos maduros que estavam iniciando sua abertura, de plantas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas na coleção de bromélias do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina. Os frutos foram levados para o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal (LFDGV) para a extração das sementes e posteriores análises.

3.2.2 Condições de germinação *in vitro*

Os apêndices plumosos das sementes foram cortados para facilitar o processo de desinfestação e na sequência os explantes foram imersos durante 2 min em álcool (70%), 25 min em solução de água sanitária comercial (1% de cloro ativo) com uma gota de Tween 20 em cada 100 ml de solução e três enxágues consecutivos com água destilada estéril, segundo os procedimentos descritos por Guerra e Dal Vesco (2010).

Foram inoculadas quatro sementes em cada tubo de ensaio (22x150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura gelificado constituído pela formulação de nutrientes minerais de MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e sacarose (30g L⁻¹), doravante denominado de meio MS básico (MSB) gelificado com 7,5g L⁻¹ de Agar-agar (Sigma®). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 antes da esterilização em autoclave por 15 min a 121 °C e 1,3 atm de pressão. O material foi mantido em sala de cultura com temperatura de 25 °C ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 50-60 μmol m⁻² s⁻¹.

3.2.3. Análise em microscopia de luz

Para as análises morfo-histoquímicas foram coletadas sementes do tempo zero (T0), dois (T2), quatro (T4), oito (T8), doze (T12) e dezoito (T18) dias depois de inoculadas no meio de cultura. Os dias de coleta foram definidos a partir dos resultados obtidos no capítulo I deste trabalho. Sementes previamente cortadas no extremo contrário ao embrião foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, *overnight* (Schmidt et al. 2010). Após a fixação, as amostras foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de etanol a cada 30 minutos (30, 50, 70, 90 e 100%). Após a desidratação, as amostras foram infiltradas em historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Nesta técnica, a utilização de soluções alcoólicas durante o processo de inclusão, ocasiona a extração dos lipídios. Portanto, estes compostos foram analisados em material fresco. As secções foram fotografadas usando câmara (Olympus DP71) acoplada a microscópio (Olympus® BX-40).

3.2.3.1 Testes histoquímicos

Para a realização dos testes histoquímicos descritos na Tabela 2, foram efetuados cortes longitudinais das sementes com 5 µm de espessura no micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. Após a coloração as lâminas foram secas ao ar e montadas com Bálsamo do Canadá. No caso do teste com Sudan Black-B, para a detecção de lipídios, foram feitos cortes longitudinais em congelamento com 10 µm de espessura no Micrótomo Criostato (Leica CM1850 UV) e as lâminas foram secas ao ar e montadas com solução aquosa de glicerina (50).

3.2.4. Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As amostras representativas das sementes foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 %, sacarose 2,0%, tamponadas com cacodilato 0,1 M (pH 7,2), pós-fixadas em 1 % tetróxido de ósmio por 4 horas. As mesmas foram desidratadas em séries de acetona (10 a 100%) e secas em ponto crítico EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). Subsequentemente, elas foram aderidas a suportes metálicos e metalizadas (Metalizador Blatec, CED 030) com ouro. Os espécimes foram visualizados e fotografados em MEV Jeol 6390 LV (JEOL Ltd.,

Tokyo, Japan, at 20 kV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME/UFSC.

Tabela 2. Testes histoquímicos aplicados nas sementes durante a germinação *in vitro* e o desenvolvimento pós-seminal de *V. friburgensis* var. *paludosa*.

COMPOSTO	TESTE HISTOQUÍMICO	COLORAÇÃO	AUTOR
Polissacarídeos ácidos	Azul de toluidina (ATO)	Reação de metacromasia Arroxeadado	Gordon & Mccandless, 1973
Fenóis-Lignina	Azul de toluidina (ATO)	Azul-esverdeado	O'Brien, et al. 1964
Lipídios totais	Sudan Black-B (SB-B)	Azul escuro	Johansen, 1940
Polissacarídeos neutros	Ácido periódico de schiff (PAS)	Rosa	Gahan, 1984
Amido	Lugol	Marrom escuro	Johansen, 1940
Proteínas totais	Azul brilhante de coomassie (CBB)	Azul	Gahan, 1984

3.2.5. Análise em microscópio de fluorescência

Cortes longitudinais à mão livre de sementes sem fixar, foram montados em lâminas e analisados utilizando-se o microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41) equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estado Unidos da América), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME/UFSC.

3.2.6. Análise em microscópio confocal (MC)

Para a análise no microscópio confocal, foi usado material fresco com secções longitudinais da semente feitas à mão livre. As secções foram montadas em lâminas e para a visualização dos núcleos, foram incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 20 µg/ml-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 30 minutos (Ouriques & Bouzon, 2008).

A análise foi realizada no Microscópio Confocal Leica TCS SP-5 (Wetzlar, Alemanha), utilizando laser ultravioleta com excitação no comprimento de 350 nm (azul) e em um espectro de emissão de 510 a 566 nm, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica -

LCME/UFSC. O processamento final das imagens foi realizado no programa LAS-AF Lite (Leica).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise em microscópio de luz

Os resultados da composição química nas sementes maduras de *V. friburgensis* var. *paludosa* revelaram diferenças entre as regiões do tegumento, do endosperma, da camada de aleurona e do embrião, como pode ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3. Compostos visualizados através dos testes histoquímicos nas sementes *V. friburgensis* var. *paludosa*.

Estrutura	Teste histoquímico	Reação	Composto visualizado
Tegumento	ATO	+	Compostos de natureza fenólica como a lignina e taninos
	SUDAN	±	Lipídios e taninos
	PAS	+	Polissacarídeos neutros
	LUGOL	–	-----
	CBB	–	-----
Camada de aleurona	ATO	+	Polissacarídeos ácidos no citoplasma.
	SUDAN	+	Lipídios no citoplasma.
	PAS	+	Polissacarídeos neutros, Celulose na parede celular.
	LUGOL	–	-----
	CBB	+	Proteínas totais no citoplasma.
Endosperma	ATO	+	Polissacarídeos ácidos na parede celular, tênue no citoplasma.
	SUDAN	±	Lipídios tênues no citoplasma
	PAS	+	Polissacarídeos neutros na parede celular e no citoplasma.
	LUGOL	+	Amido no citoplasma.
	CBB	+	Proteínas totais no citoplasma.
Embrião	ATO	+	Polissacarídeos ácidos
	SUDAN	+	Lipídios
	PAS	+	Polissacarídeos neutros
	LUGOL	+	Amido
	CBB	+	Proteínas

+ Reação positiva; – Reação negativa; ± Reação tênue

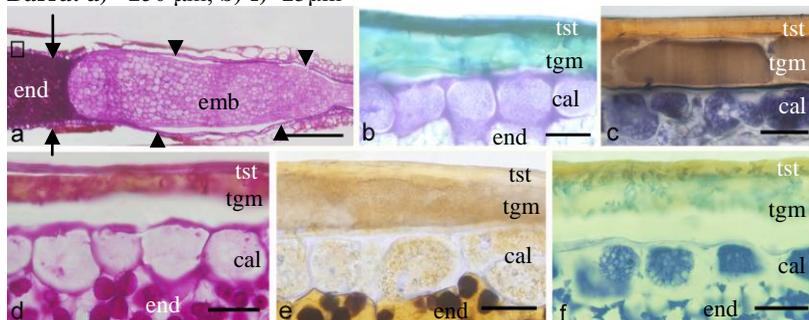
3.3.1.1 Tegumento

As sementes da espécie em estudo foram classificadas como bitegumentadas. Este tipo de semente apresenta testa (tegumento externo) e tegmen (tegumento interno) na maturidade (Souza, 2009). Segundo Reitz, (1983) na semente madura de algumas bromélias, as células da camada externa separam-se da interna em longas estrias que ficam ligadas a esta apenas pela base, formando uma proteção de pêlos aéreos ou apêndices plumosos. Da mesma forma, Scatena et al (2006), identificaram a testa em sementes de várias espécies do gênero *Tillandsia*, a qual está diferenciada em apêndices plumosos. De acordo com Muller (1895), estes apêndices estão altamente suberizados exibindo características higroscópicas que parecem ter um papel importante na germinação das sementes. Portanto, nas secções histológicas da espécie estudada apenas foi observado o tegmen e uma parte da testa, pois os pelos plumosos foram previamente retirados na fixação do material para facilitar a inclusão na resina (Fig. 4). Segundo Benzing 2000, nas bromélias o tegumento interno está composto por camadas de células de natureza esclerenquimáticas que variam entre taxa e distinguem certos gêneros.

Nas secções longitudinais das sementes maduras de *V. friburgensis* var. *paludosa* observou-se o tegmen reduzido a uma única camada celular e uma parte da testa representada por uma camada de células suberizadas (Fig. 4). As células do tegmen quando tratadas com ATO mostraram coloração azul esverdeada indicando a presença de compostos de natureza fenólica como a lignina. Na camada do tegumento externo (testa) mostrou-se o aspecto característico dos compostos tânicos, que se coram em verde mais escuro (Fig. 4b). No tegmen tratado com SB-B ocorreu uma leve reação no citoplasma apresentando uma tênue coloração escura, positiva para lipídios ou radicais hidrofóbicos, já a testa apresentou uma cor castanha alaranjada que pode ser ocasionada pela presença de taninos, confirmando o descrito no teste com ATO. Também as células do tegmen apresentaram-se maiores comparadas com as demais células da semente (Fig. 4c). Quando as secções do tegumento foram submetidas à reação com o PAS, o citoplasma e a parede celular reagiram positivamente indicando a presença de polissacarídeos neutros (Fig. 4d). Porém, segundo Geier (1980) o PAS também reage com compostos fenólicos quando muito concentrados. Com lugol não houve reação, indicando

que os polissacarídeos neutros visíveis no teste com PAS não são amido (Fig. 4e). De acordo com Werker (1997), o amido é encontrado em tegumentos nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente, sendo posteriormente consumido e desaparece na semente madura ou permanece em pequenas quantidades. Assim mesmo, com o uso do CBB, não foi verificada a presença de compostos protéicos nos tecidos dos envoltórios seminais (Fig. 4f). Resultados semelhantes foram encontrados nos tegumentos de espécies do gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae) (SANTOS, 2003).

Figura 4. Secções longitudinais da semente madura de *V. friburgensis* var. *paludosa*: **a)** Secção submetida ao PAS. A camada de aleurona está rodeando o endosperma (setas) e o embrião (cabeça de setas). Na região micropilar ao nível do embrião a camada de aleurona é a parte exclusiva do endosperma (cabeça de setas). **b)-f)** Detalhe da região marcada em quadro (□) na figura a) onde encontrase o tegumento e a camada de aleurona submetidas a diferentes testes histoquímicos: **b)** Azul de toluidina (ATO); **c)** Sudan Black B (SB-B); **d)** Ácido periódico de schiff (PAS); **e)** Lugol; **f)** Azul brilhante de coomassie (CBB). **cal:** camada de aleurona; **emb:** embrião; **end:** endosperma; **tgm:** tégmen; **tst:** testa. **Barra:** a)= 250 µm; b)-f)=25µm



As características observadas no tegumento das sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa*, determinam sua função como protetor do embrião e regulador da germinação. Os compostos fenólicos, principalmente taninos, têm reconhecidamente a função de inibir herbívoros, pois em altas concentrações em frutos, folhas, sementes ou demais tecidos jovens, reagem com enzimas do trato digestivo destes animais, tornando-se impalatáveis aos fitófagos (MONTEIRO et al, 2005). Segundo Werker (1997) a presença de compostos fenólicos nas sementes também atua na proteção contra fungos e bactérias, tendo ainda possível efeito contra vírus, além de auxiliar na estruturação dos

tegumentos, tornando-os mais duros e impermeáveis, funcionando como inibidores da germinação.

3.3.1.2 Camada de aleurona no Endosperma

O endosperma das sementes apresentou-se rodeado pela camada da aleurona. Esta camada está composta de um estrato de células dispostas em baixo dos tegumentos seminais, na região periférica do endosperma, rodeando também o embrião, quando ele ainda não iniciou a germinação (Fig. 4a). Na região micropilar da semente, ao nível do embrião, a camada é a parte exclusiva do endosperma, pois entre esta camada e o embrião, o parênquima do endosperma é reduzido, assim como também foi observado em sementes do gênero *Tillandsia* (FIORDI et al., 2001) (Fig. 4a). As células da camada de aleurona apresentaram paredes engrossadas e formato arredondado, as quais reagiram metacromaticamente quando tratadas com ATO, indicando a presença de polissacarídeos ácidos no citoplasma e na parede celular (Fig. 4b). No entanto quando tratadas com SB-B, houve uma reação positiva no citoplasma, indicando a presença de lipídios (Fig. 4c). Através dos resultados utilizando o PAS, pode se afirmar que os polissacarídeos neutros encontram-se principalmente como constituintes da parede celular, indicando a presença de celulose como componente microfibrilar (Fig. 4d). Com lugol confirmou-se a ausência de compostos de reserva como o amido, nos citoplasmas destas células (Fig. 4e). Ao contrário, com o CBB foi observada uma reação positiva, indicando a grande presença de materiais protéicos no citoplasma das células, os chamados grãos de aleurona, que caracterizam esta camada de células (Fig. 4f). Bethke et al., (1997), descrevem esta camada como um tecido diferenciado que não se divide e não é fotossintético e as suas células com citoplasma com numerosos vacúolos de armazenamento de proteínas que ocupam a maior parte da célula. Segundo Bewley & Black, (1978) estas células engrossam suas paredes, apresentam corpos protéicos, e o mais importante, permanecem vivas, diferente das células internas do endosperma. Assim, esta camada vai ajudar a mobilizar as reservas das sementes durante a germinação, sintetizando e secretando uma variedade de enzimas hidrolíticas que participam na degradação de proteínas, lipídios e paredes celulares do endosperma (RITCHIE et al., 1999).

Durante os dias avaliados desde a inoculação da semente no meio de cultura até o desenvolvimento pós-seminal (T0 até T18), as células da camada de aleurona, conservaram suas características e não

apresentaram uma alteração expressiva. Só foi distinguida uma diminuição no conteúdo de proteínas no seu citoplasma, possivelmente devido a sua função na síntese e secreção de enzimas hidrolíticas (Fig. 5 a Fig. 10).

3.3.1.3 Endosperma e mobilização de reservas

Conforme o discutido no capítulo I desta dissertação, as sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* no segundo dia no meio de cultura encontraram-se na fase de embebição com seus processos metabólicos ativos, tendo iniciado a atividade respiratória, síntese de mRNA e proteínas, síntese e duplicação de DNA e a degradação de reservas. Portanto, era de se esperar que a partir do segundo dia (T2), fossem visíveis mudanças na composição do endosperma através dos testes histoquímicos.

O endosperma da semente foi observado abaixo das células da camada de aleurona, apresentando várias camadas de células parenquimáticas, arredondadas e isodiamétricas. Nas paredes das células do endosperma foi constatada a presença de polissacarídeos ácidos identificados pela reação metacromática de ATO, enquanto que o citoplasma apresentou tênues granulações ácidas. Durante o tempo avaliado (T0 a T18) observou-se uma diminuição muito tênue destes compostos (Fig. 5).

A coloração pelo SB-B mostrou uma leve reação no endosperma, por conseguinte uma baixa presença de compostos hidrofóbicos, revelando que o lipídio não é uma reserva de importância para estas sementes. Esta leve reação no citoplasma mantém-se na mesma proporção, durante os diferentes dias analisados na germinação e desenvolvimento pós-seminal (T0 a T18) (Fig. 6).

Com o uso do PAS, observou-se que os polissacarídeos neutros apresentaram-se, principalmente, na forma de grãos no citoplasma como compostos de reserva e como constituintes da parede celular, indicando a presença de celulose (Fig. 7). Enquanto a análise histoquímica utilizando-se lugol confirmou que a intensa aglomeração dos polissacarídeos neutros, são grãos de amido distribuídos pelo endosperma em pequenos amiloplastos, sendo que à medida que as sementes germinavam e as plântulas se estabeleciam, esta substância de reserva era utilizada (T0 a T18) (Fig. 8). Este processo ocorre devido às enzimas degradadoras de amido (α -amilase, β -amilase e a amido fosforilase) que vão atuar desmembrando as estruturas das cadeias carbônicas dos grânulos de amido em estruturas menores, como a

maltose e a glucose (BEWLEY & BLACK, 1994; BUCKERDIGE et al., 2004b).

Figura 5. Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de Azul de toluidina (ATO) durante os dias de inoculação no meio de cultura. **a)** Dia 0, antes de inoculação; **b)** Dia 2; **c)** Dia 4 (germinação); **d)** Dia 8; **e)** Dia 12 (aparece o primeiro eofilo); **f)** Dia 18 (aparece o segundo eofilo). **cal:** camada de aleurona; **end:** endosperma. **Barra:** 25µm

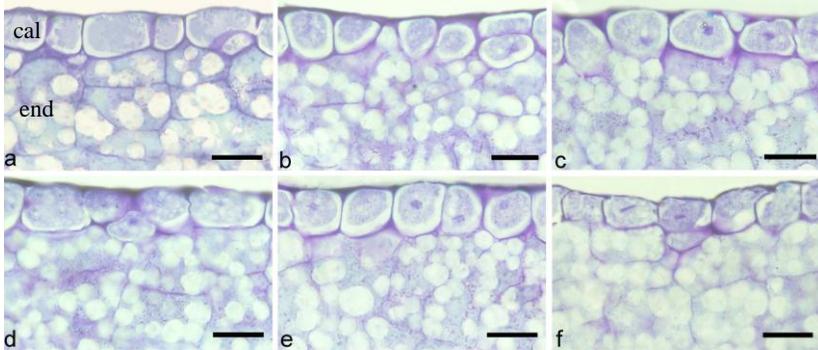


Figura 6. Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de Sudan Black B (SB-B) durante os dias de inoculação no meio de cultura. **a)** Dia 0, antes de inoculação; **b)** Dia 2; **c)** Dia 4 (germinação); **d)** Dia 8; **e)** Dia 12 (aparece o primeiro eofilo); **f)** Dia 18 (aparece o segundo eofilo). **cal:** camada de aleurona; **end:** endosperma. **Barra:** 25µm

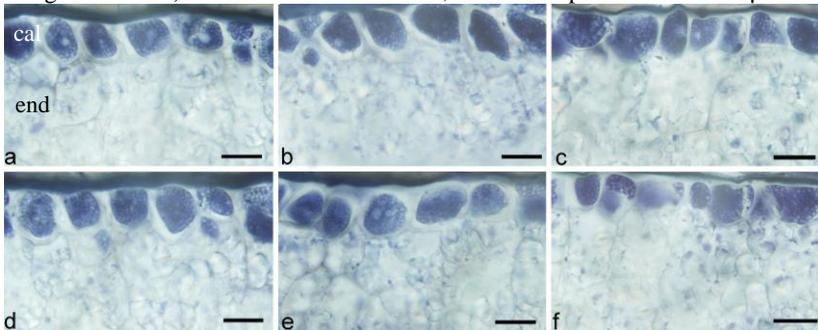


Figura 7. Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de Ácido periódico de schiff (PAS) durante os dias de inoculação no meio de cultura. **a)** Dia 0, antes de inoculação, presença de grãos de amido (seta); **b)** Dia 2; **c)** Dia 4 (germinação); **d)** Dia 8; **e)** Dia 12 (aparece o primeiro eofilo); **f)** Dia 18 (aparece o segundo eofilo). **cal:** camada de aleurona; **end:** endosperma. **Barra:** 25µm

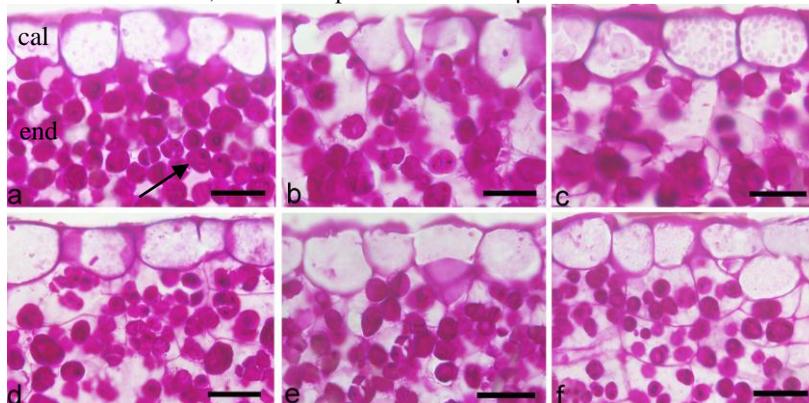
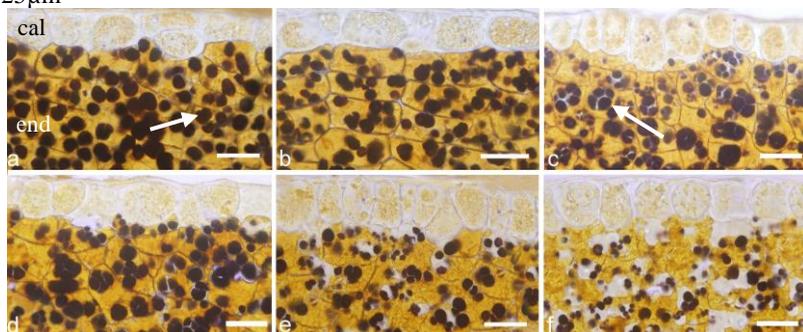


Figura 8. Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de lugol durante os dias de inoculação no meio de cultura. **a)** Dia 0, antes de inoculação, presença de grãos de amido (seta); **b)** Dia 2; **c)** Dia 4 (germinação). Observa-se a presença de grãos compostos (seta); **d)** Dia 8; **e)** Dia 12 (aparece o primeiro eofilo); **f)** Dia 18 (aparece o segundo eofilo). **cal:** camada de aleurona; **end:** endosperma. **Barra:** 25µm



De acordo com Silva et al. (1998), a diminuição do teor de amido pode estar relacionada à sua degradação para a produção de glicose como fonte de energia para várias reações metabólicas que

ocorrem durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas e é também uma fonte de glicose para a biossíntese de celulose. A forma como o amido apresentou-se, indicou que se trata de grãos compostos, que foram se agrupando (Fig. 8c). Esta forma de agrupamento também foi observada nas sementes de várias espécies do gênero *Theobroma* (SANTOS, 2003). Segundo Werker (1997), a morfologia dos grãos varia entre as espécies em tamanho, forma e relação amilose/amilopectina. Podem ser encontrados grãos isolados ou compostos por grânulos de várias formas e tamanhos. Neste sentido, observa-se em alguns casos que o endosperma apresenta-se com substâncias de reserva, polissacarídeos e hemiceluloses, armazenados nas paredes celulares (BUCKERIDGE et al. 2000, BELTRATI & PAOLI 2003). Estes polissacarídeos são degradados após a germinação e seus produtos são utilizados como fonte de energia para o crescimento inicial das plântulas e podem também desempenhar funções secundárias como o controle da embebição e distribuição de água nos tecidos das sementes (BUCKERIDGE & REID, 1996). Apesar de ter havido distinção na flacidez das paredes celulares do endosperma nos últimos dias avaliados (T12, T18), não houve alteração expressiva na intensidade de coloração pelo ATO ou pelo PAS (Fig. 5; Fig. 7). No entanto, é difícil afirmar que há mobilização de polissacarídeos de reserva de parede na espécie estudada, o que demonstra a necessidade de novos estudos mais específicos para corroborar esta hipótese.

No endosperma tratado com CBB, observou-se uma reação positiva indicando alta presença de materiais protéicos no formato de grãos amorfos desorganizados nos citoplasmas das células. Estes materiais também apresentaram uma diminuição durante os dias avaliados (T0 a T18) (Fig. 9a-f), ocasionada provavelmente pelas enzimas hidrolíticas sintetizadas na camada de aleurona. As características protéicas destas enzimas também poderiam estar relacionadas com a reação positiva deste teste. Segundo Bewley & Black, (1994), as proteases estão categorizadas como endopeptidases, aminopeptidases e carboxipeptidases e vão hidrolisar as proteínas em seus aminoácidos constituintes.

Mediante a dupla coloração com PAS e CBB no endosperma, observou-se a presença dos grãos de amido associados ao material protéico (glúten), e sua diminuição gradual através do tempo analisado (Fig. 10a-f). Segundo Esau (1972), as proteínas na semente encontram-se em duas formas principais, os glútenes de estrutura amorfa, e os grãos de aleurona. De acordo com a autora, os glútenes são comuns nas células que contém amido nas monocotiledôneas como os cereais.

Figura 9. Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas ao teste de Azul brilhante de coomassie (CBB) durante os dias de inoculação no meio de cultura. **a)** Dia 0, antes de inoculação; **b)** Dia 2; **c)** Dia 4 (germinação); **d)** Dia 8; **e)** Dia 12 (aparece o primeiro eofilo); **f)** Dia 18 (aparece o segundo eofilo). **cal:** camada de aleurona; **end:** endosperma. **Barra:** 25µm

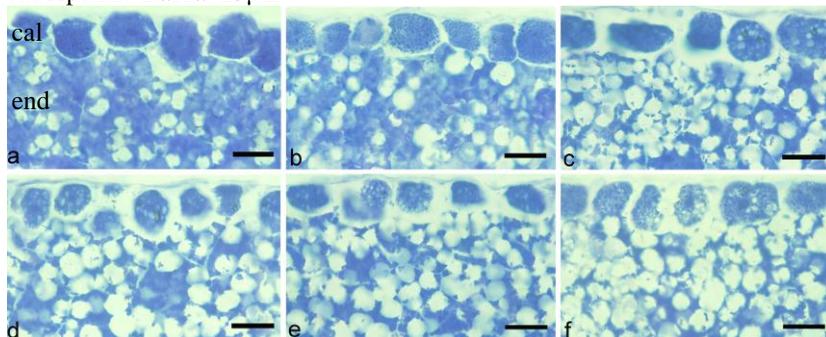
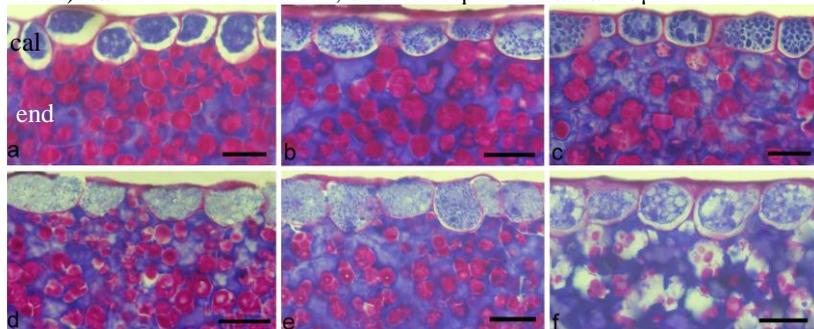


Figura 101. Secções longitudinais do endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* submetidas à coloração dupla de PAS e CBB durante os dias de inoculação no meio de cultura. Observa-se a presença dos grãos de amido associados ao material protéico e sua diminuição gradual através do tempo analisado. **a)** Dia 0, antes de inoculação; **b)** Dia 2; **c)** Dia 4 (germinação); **d)** Dia 8; **e)** Dia 12 (aparece o primeiro eofilo); **f)** Dia 18 (aparece o segundo eofilo). **cal:** camada de aleurona; **end:** endosperma. **Barra:** 25µm



A análise histoquímica evidenciou a predominância de reservas de amido e de material protéico no endosperma, mas segundo a caracterização qualitativa considerou-se como principal material de reserva o amido, pois apresentou uma maior diminuição ao final da avaliação, comparado às proteínas. Portanto, as sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* são de tipo endosperma amiláceo. As células

do endosperma apresentaram paredes finas e o material de reserva localizou-se no citoplasma e possivelmente nas paredes celulares. O início da degradação deste material foi distinguido já no segundo dia (T2) depois de as sementes serem dispostas em condições para a germinação. Neste momento, de acordo com Bewley & Black, (1994) e Castro et al, (2004) as sementes de *V. friburgensis* se encontram na fase II da embebição, onde apresentam seus processos metabólicos ativos como a síntese e duplicação de DNA, início da degradação de reservas e alongamento das células da radícula, confirmando assim, o mencionado no capítulo I. Nestas sementes, a mobilização das reservas tem início com a embebição, sendo que isto provavelmente está relacionado ao reparo de estruturas celulares antes da germinação (BUCKERIDGE et al., 2004b).

Os compostos do metabolismo primário como o amido e as proteínas, são compartimentalizados como materiais de reserva para posterior consumo durante a germinação, de maneira a prover o crescimento do embrião, servindo como fonte de energia para organização de novas estruturas celulares, constituindo um importante passo na disponibilização de substratos para manutenção do crescimento de plântulas (BORGES, 2003). Segundo Buckeridge et al. (2004a) dentre estes compostos, as proteínas são as responsáveis por armazenar nitrogênio essencial para a realização da síntese de proteínas, ácidos nucléicos e compostos secundários na plântula em crescimento.

O endosperma apresentou-se exatamente em frente ao ápice do cotilédone. Nesta região as células se apresentam ricas em substâncias de reservas quando as sementes ainda não estão submetidas às condições de germinação (T0), e os grãos de amido foram observados freqüentemente aderidos à superfície do cotilédone haustorial (Fig. 11a). Verificou-se uma quebra enzimática diferenciada das reservas: a diminuição do material de reserva apresentou-se simultânea em todo o endosperma, mas foi notoriamente maior na região próxima ao embrião, ao redor do ápice do cotilédone em comparação com o endosperma mais calazal. Ao final do desenvolvimento pós-seminal (T18), esta região se apresenta com as células do endosperma reduzidas a apenas paredes celulares, como conseqüência do maior consumo dos compostos de reserva neste local (Fig. 11b). Fiordi et al. (2001), em sementes do gênero *Tillandsia*, encontraram esta região com características similares. Estes autores encontraram a presença considerável de protease na camada de células que está rodeando o endosperma, na epiderme dos cotilédones e no endosperma adjacente. Portanto, é de presumir que em *V. friburgensis* var. *paludosa*, a camada de aleurona junto com o

cotilédone haustorial fornecem as enzimas hidrolíticas para degradar as reservas. Assim, o cotilédone haustorial, além da função de absorção e condução de reservas a partir do endosperma para a plântula, também poderia estar relacionado com o abastecimento de enzimas digestivas ao endosperma. No último dia avaliado neste estudo (T18) não haviam sido consumidas todas as reservas disponíveis na semente, provavelmente porque nesse momento a plântula formada começa a nutrir-se pelos elementos do meio de cultura.

Na região do endosperma em frente ao ápice do cotilédone, também foi observada a presença de um complexo de paredes celulares empilhadas, que não apresentaram compostos protéicos e sim grãos de amido (Fig. 11c). Estas camadas provavelmente indicam que o endosperma também desempenha um papel na regulação do desenvolvimento do embrião. Isto também é sugerido por (FIORDI, et al., 2001), cujos autores encontraram um complexo similar que se apresentou envolvendo quase por completo o embrião da bromélia de *Tillandsia*. Portanto, o endosperma não seria um tecido exclusivamente de reserva.

3.3.1.4 Embrião

O embrião na semente madura apresentou reação metacromática ao ATO indicando a existência de substâncias ácidas (Fig. 12a) e quando foi submetido ao SB-B observou-se uma reação positiva indicando a presença de lipídios. Nas secções longitudinais submetidas à reação com o CBB, os citoplasmas das células do embrião reagiram positivamente (Fig. 12b,c). Assim, as reações histoquímicas realizadas com CBB indicaram a presença de proteínas na maioria dos tecidos das sementes (camada de aleurona, endosperma, embrião) exceto no tegumento. Bouzon (1999) afirma que as proteínas são os principais constituintes estruturais das organelas celulares e estão presentes no citoplasma, como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas.

Com o PAS, as paredes das células do embrião reagiram positivamente indicando a presença de polissacarídeos (Fig. 12b,c), e no citoplasma foram visíveis pequenos grânulos os quais são considerados grãos de amido graças à reação com Lugol (Fig 12d). Portanto, além do endosperma, a semente também apresenta substâncias de reserva no embrião.

Na semente madura (T0) o embrião apresentou-se como uma estrutura homogênea, sem delimitação definida de suas partes, sendo apenas visível a protoderme unisseriada e um tênue procâmbio

constituído por células alongadas no eixo embrionário (Fig 12a-c). Segundo Esau, (1972) um sistema procambial contínuo desde o hipocótilo até os cotilédones se encontra normalmente diferenciado no embrião. No dia dois (T2) evidenciou-se a diferenciação do tecido embrionário, e no dia quatro (T4) apresentou-se a emissão da bainha cotiledonar na germinação (Fig 12e,f). Analisando as sementes maduras que ainda não estavam submetidas à germinação (T0) e as amostras do T2 e T4, fica evidente que a presença de um embrião com estruturas mais definidas é resultado da atividade metabólica, pois aparece após a semente iniciar seu processo de embebição. De acordo com Koslowski & Pallardy (1997), com a reintrodução da água, durante a embebição da semente, os processos metabólicos e fisiológicos inerentes ao processo de germinação são prontamente reiniciados.

Em monocotiledôneas, inclusive na ordem Poales, a morfologia do embrião só pode ser comparada por meio do estudo do desenvolvimento pós-seminal (EAMES 1974), visto que suas sementes, na maioria, apresentam embrião indiferenciado (WERKER 1997; GPWG 2001). Segundo Duarte et al. (2009) as sementes da bromélia *Dyckia goehringii*, apresentam um embrião ovalado, indiferenciado, antes do início da germinação. Quando ocorre o crescimento do eixo embrionário, e posteriormente a protusão da bainha cotiledonar, possibilita-se distinguir o haustro cotiledonar, que se mantém no interior da semente. Anastacio e Santana (2010) encontraram em *Ananas ananassoides* (Baker) L. B. Sm. embriões pouco desenvolvidos, o que pode ser um indicativo da dormência morfológica. Segundo a classificação apresentada por Cardoso (2004), a dormência morfológica é um tipo de dormência de natureza primária que está relacionada às sementes que são dispersas com o embrião não diferenciado ou não completamente desenvolvido. Portanto, é possível que o embrião pouco diferenciado na espécie estudada, esteja relacionada a este tipo de dormência.

Mediante as análises histoquímicas, foi possível confirmar o padrão de desenvolvimento pós-seminal descrito na caracterização morfológica da espécie estudada (capítulo I deste trabalho). A parte foliácea do cotilédone que emerge dos restos seminais e a parte haustorial que permanece no interior dos tegumentos e em contato com o tecido de reserva são visíveis após o quarto dia (T4) da germinação (Fig. 12f).

Figura 11. Secções longitudinais do embrião e endosperma da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa*. **a)-b):** Dupla coloração (CBB-PAS); **a)** Dia 0, apresenta grãos de amido perto do cotilédone (seta) **b)** Dia 18, as células do endosperma reduzidas a apenas paredes celulares (seta), como consequência consumo das reservas. Observam-se os grãos de amido no cotilédone (*); **c)** Dia 2 com teste de ATO. Complexo de paredes celulares empilhadas (seta) perto do cotilédone. **end:** endosperma; **cot:** cotilédone. **Barra:** 50µm

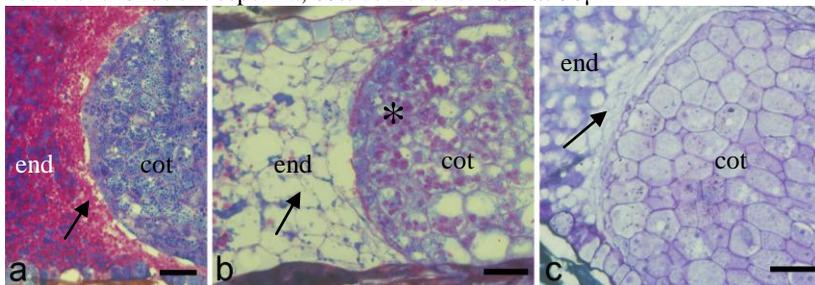
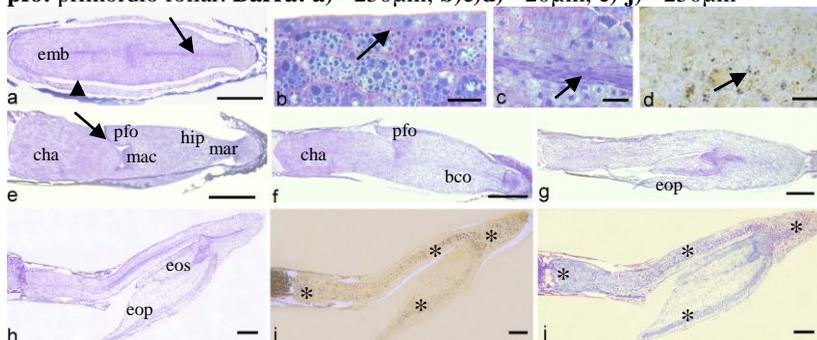


Figura 12. Secções longitudinais durante a germinação e desenvolvimento pós-seminal de *V. friburgensis* var. *paludosa*. Testes com ATO (**a, e-h**) coloração dupla (PAS-CBB) (**b,c,j**) e LUGOL (**d,i**). **a,b,c,d)** Embrião na semente madura (T0); **a)** estrutura homogênea, observa-se a protoderme (cabeça de seta) e o procâmbio (seta); **b)** Detalhe da protoderme (seta); **c)** Detalhe das células alongadas do procâmbio (seta); **d)** Células do embrião com poucos grãos de amido (seta); **e)** Dia 2, fenda lateral na base do cotilédone (seta), que marca o meristema apical do caule; **f)** Dia 4; emissão da bainha cotiledonar e a parte haustorial do cotilédone permanece no interior dos tegumentos em contato com o tecido de reserva; **g)** Dia 12, visível a aparição do primeiro eofilo; **h-j)** Dia 18 visível a aparição do segundo eofilo; **i)** Observa-se a acumulação de amido (*); **j)** Acumulação de amido e proteína (*). **bco:** bainha cotiledonar; **cha:** cotilédone haustorial; **eop:** eofilo primário; **eos:** eofilo secundário; **hip:** hipocótilo; **mac:** meristema apical de caule; **mar:** meristema apical radicular; **pfo:** primórdio foliar. **Barra:** **a)**= 250µm; **b)c)d)**= 20µm; **e)-j)**= 250µm



A forma de emissão do primórdio foliar está de acordo com o citado por Esau (2000), para as plantas monocotiledôneas. Segundo a autora, o cotilédone desenvolve-se de tal forma que pode parecer uma continuação do eixo embrionário, ocorrendo uma depressão lateral na base do cotilédone, marcando a posição do meristema apical do caule. Este meristema pode ser percebido como uma protuberância de células embrionárias no fundo da depressão, formando o primeiro primórdio foliar que surge através de uma fenda, quando a semente germina. No presente trabalho, essa fenda foi identificada no dia dois (T2) após a inoculação no meio de cultura (Fig. 12e).

Depois da germinação, houve continuação da divisão celular nos meristemas apicais, e a diferenciação de células e tecidos que levaram à formação da plântula (Fig. 12g). Isto ocorre mediante o alimento solúvel (reservas hidrolisadas no endosperma) absorvido pelo cotilédone e transportado para o eixo embrionário, através do tecido vascular. A utilização de técnicas de histoquímica permitiu uma visualização da distribuição na plântula formada (T18) dos polissacarídeos ácidos (ATO), do amido (LUGOL), dos compostos protéicos (CBB) e polissacarídeos neutros (PAS) (Fig. 12h-j). No dia 18 (T18) foi evidenciada uma maior quantidade de proteínas e grãos de amido, acumulando-se no cotilédone, na bainha cotiledonar e no eixo embrionário. Menores quantidades foram observadas nos feixes vasculares das folhas em formação.

Provavelmente, a nova acumulação do amido na plântula é devido a uma degradação da reserva primária no endosperma maior do que a necessária para o desenvolvimento pós-seminal. Portanto, para manter o equilíbrio osmótico, o excesso seria convertido na reserva de amido, sendo que esta pode ser a razão pela qual no final da avaliação (T18) neste trabalho ainda não haviam sido consumidas todas as reservas presentes no endosperma.

3.3.1.5 Cotilédone haustorial

Nesta espécie a parte apical do cotilédone está imersa no endosperma e enche a semente mais na porção calazal, assim como também foi observado em sementes de *Tillandsia* (FIORDI et al. 2001). As células do cotilédone haustorial não apresentaram características distintas das outras células do embrião, relacionadas ao espessamento na parede celular. Sua superfície apresentou-se lisa, contrário ao observado no cotilédone da *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), o qual tem função haustorial e apresenta invaginações da protoderme e tecidos subjacentes,

características que podem estar associadas a uma maior eficiência no transporte de material partir do endosperma para o embrião (MOURA et al, 2010).

O cotilédone haustórial de *V. friburgensis* var. *paludosa* é composto por células parenquimáticas e uma camada epitelial. Nas células parenquimáticas distinguiu-se o início dos feixes vasculares que vão por todo o embrião (Fig.13a). No dia 4 (T4) também foram distinguidos vários acúmulos de amido, enquanto que nas células epiteliais não foram visíveis (Fig.13b). Já no dia 18 (T18) o acúmulo de amido no cotilédone foi maior ocorrendo também nas células epiteliais (Fig. 13c). Segundo Reid, (1971) se os níveis de sacarose são altos, estes podem ser utilizados para a síntese temporal de amido. Abaixo da epiderme o cotilédone de *Tillandsia* também apresentou um parênquima cheio de nutrientes armazenados (FIORDI et al., 2001).

Mediante estas observações sugeriu-se que o cotilédone não apresenta divisão celular e portanto, não apresenta crescimento em direção ao endosperma, ocupando a mesma posição na semente durante o desenvolvimento pós-seminal. Ao contrário do que ocorre com as sementes de palmeiras, nas quais o haustório é característico e se desenvolve para dentro do endosperma, ocupando quase a sua totalidade (BUCKERIDGE et al. 2004b, STEINMACHER, 2005; FABRICIO, 2010).

3.3.2 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Assim como foi observado na microscopia óptica, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) também é possível distinguir a morfologia dos diferentes tipos de células nas sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa*.

No tegumento foram visíveis o tegmen e parte da testa, a qual está diferenciada em apêndices plumosos. Segundo Beltrati & Paoli (2003), estômatos são observados no tegumento das sementes de cerca de 30 famílias de angiospermas. Paiva et al. (2006) verificaram a existência de estômatos em tegumentos de *Swietenia macrophylla* e afirmaram que estes favorecem o processo de embebição e germinação. Na espécie em estudo, não foram observados estômatos, entretanto, seu processo germinativo não foi afetado, uma vez que a mesma apresentou elevado índice de germinação.

Figura 13. Secções longitudinais do cotilédone haustorial de *V. friburgensis* var. *paludosa*. **a)** Submetida ao teste com ATO no dia 4 (T4). Observa-se a superfície lisa do cotilédone e a presença de células parenquimáticas (cabeça de seta) com uma camada epitelial (*). Distinguiu-se o início dos feixes vasculares (seta); **b)** Dia 4, Presença de grãos de amido nas células parenquimáticas (seta); **c)** No dia 18, aumenta a acumulação do amido nas células parenquimáticas e na camada epitelial do cotilédone (setas). **cal:** camada de aleurona; **end:** endosperma. **Barra:** 20µm

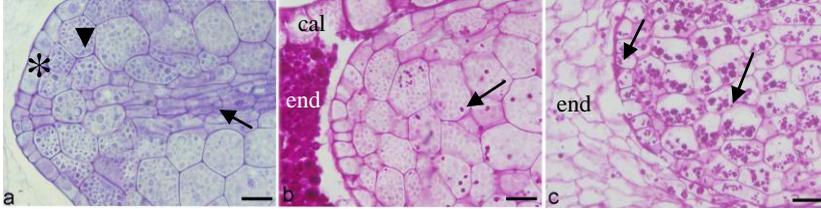
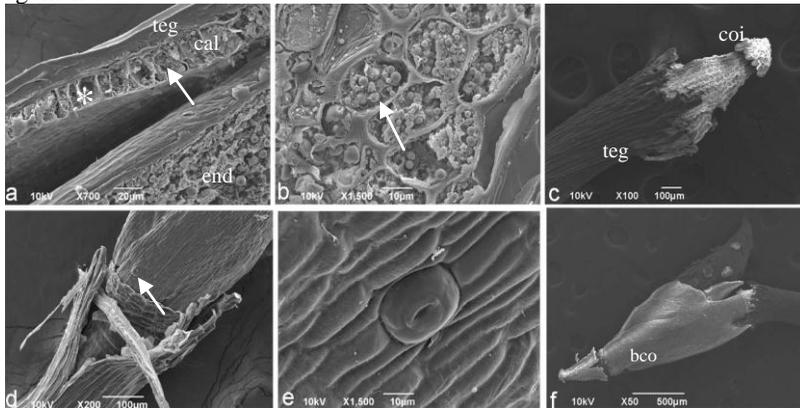


Figura 14. Semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). **a-b)** Vista longitudinal da semente madura. **a)** rede protéica (seta) e espaços do material lipídico (*) na camada de aleurona; **b)** Células do endosperma com grãos de amido (seta); **c)** Início da emergência, visível a coifa que protege os tecidos que saem dos restos seminais; **d)** Germinação da semente no dia 8. Presença de estômatos (seta) na bainha cotiledonar; **e)** Detalhe do estômato; **f)** Plântula no dia 18 (T18). Presença de tricomas peltados junto a estômatos nas primeiras folhas formadas (seta). **bco:** bainha cotiledonar; **cal:** camada de aleurona; **coi:** coifa; **end:** endosperma; **teg:** tegumento.



As células da camada de aleurona mostram a rede protéica e os espaços do material lipídico que foi extraído pela acetona durante o processo de desidratação do material (Fig. 14a). O endosperma

apresenta células que contêm grãos de amido de tamanho distinto, mergulhados em densa rede protéica (Fig. 14b). Durante o início da emergência é visível a coifa, que aparece protegendo os tecidos que saem dos restos seminais (Fig. 14c). No 8º dia, observou-se como a bainha cotiledonar continua emergindo já com estômatos formados (Fig. 14d-e). Provavelmente, estes estômatos já estariam formados no embrião maduro, assim como foram registrados estômatos nos embriões das cicadales (PLANT e NAUTIYAL, 1962), pois segundo Esau (1972), os estômatos formam-se mediante divisões diferenciais na protoderme. Porém, nesse momento na espécie estudada não foram encontrados tricomas.

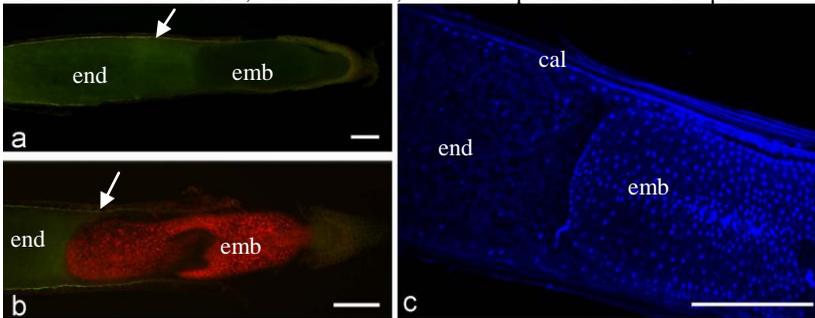
No 18º dia (T18) percebeu-se a bainha cotiledonar envolvendo quase completamente as primeiras folhas em formação. Foi possível detectar a presença de tricomas peltados junto a estômatos na primeira e segunda folha (Fig. 14f). Em *Aechmea nudicaulis* e *Neoregelia cruenta*, os tricomas foram observados em MEV, a partir do 14º e 18º dia após o início do teste de germinação, e em *Vriesea neogutinoso*, as escamas foram produzidas já na primeira folha no 18º dia (Mantovani e Iglesias, 2005). De acordo com isto, a formação de escamas ocorreu em um tempo menor que o citado por Benzing (1978, 2000) que indica que o menor tempo conhecido para o surgimento de escamas em espécies de Tillandsioideae seria de três meses após a germinação. Mas, no presente trabalho, não foi comprovado se as escamas já têm capacidade de absorção. Entretanto, a ausência das raízes adventícias na fase inicial da germinação faz a plântula ser dependente das folhas para a sua sobrevivência, sendo possivelmente a razão para a formação precoce dos tricomas na plântula. Tal fato auxiliaria a espécie estudada a superar a fase de estabelecimento de plântulas, nas condições abióticas vigentes nas restingas. Nos indivíduos adultos de Bromeliaceae, principalmente das sub-famílias Bromelioideae e Tillandsioideae, os tricomas são importantes para a absorção de água e nutrientes por via foliar (PIERCE et al. 2001).

3.3.3 Análises em microscópio de fluorescência

Nas células vegetais, a autofluorescência ocorre devido à presença do pigmento fotossintetizante clorofila *a*, bem como do composto de parede celular, a lignina. Assim, as paredes celulares produzem autofluorescência com coloração esverdeada e os cloroplastos apresentam autofluorescência avermelhada (Alché et al., 2010). De acordo com isto, através do uso do microscópio de fluorescência,

identificaram-se diferenças entre as sementes no dia 0 (T0) e no quarto dia após a inoculação no meio de cultura. No dia 0, apenas a camada de aleurona é visível nas sementes, devido á autofluorescência da lignina (Fig. 15a). Conforme Morrison et al. (1975), estas células caracterizam-se por apresentar paredes engrossadas altamente fluorescentes. Enquanto no dia 4, o embrião também é visível por uma cor vermelha ocasionada pela autofluorescência da clorofila *a* presente nos cloroplastos, indicando a presença de atividade do metabolismo (Fig. 15b).

Figura 15. Secções longitudinais da semente de *V. friburgensis* var. *paludosa* analisadas em microscopia de fluorescência. **a-b)** Autofluorescência da sementes.; **a)** Semente madura antes de inocular no meio de cultura (T0), apresentando autofluorescência na camada de aleurona (seta); **b)** Semente germinando no dia 4 após a inoculação no meio de cultura apresentando autofluorescência na camada de aleurona (seta) e no embrião; **c)** Semente madura antes de inocular no meio de cultura (T0) no MC, com o fluorocrómo DAPI, apresentando maior fluorescência na camada de aleurona e no embrião. **cal:**camada de aleurona; **emb:**embrião; **end:**endosperma. **Barra:** 250µm



3.3.4 Análises em microscópio confocal

Nos casos em que, estruturas celulares não apresentaram autofluorescência, (embrião na semente madura) a amostra foi submetida a um marcador fluorescente, o DAPI (PORTER e FEIG 1980). O uso do DAPI foi especificamente para visualizar o DNA nuclear (SHERR et al. 1993) e por excitação com luz ultravioleta (365 nm) o complexo DAPI-DNA emitiu fluorescência de cor azul. Utilizando o Microscópio confocal, foi possível distinguir a fluorescência dos núcleos das células da camada de aleurona e os núcleos do embrião na semente madura de *V. friburgensis* var. *paludosa* (Fig. 15c). A ausência da fluorescência dos núcleos das células do

endosperma pode ser devido a sua composição por células não viáveis que apresentam seu DNA degradado.

3.4. CONCLUSÃO

As análises morfo-histoquímicas confirmam e complementam o padrão de desenvolvimento pós-seminal descrito previamente na caracterização morfológica da *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* contemplada no capítulo I deste trabalho. Desta forma, permitiram caracterizar os distintos tecidos na semente e identificar diferenças na composição química, relacionadas com a sua função durante os processos de germinação e desenvolvimento pós-seminal.

Os compostos fenólicos no tegumento permitem sua estruturação e impermeabilidade e oferecem proteção à semente contra o ataque de outros organismos. A principal fonte de reserva da semente são os polissacarídeos neutros (grãos de amido) e compostos protéicos no endosperma, os quais também estão presentes em menor quantidade no embrião. Durante a germinação e a formação das plântulas estas reservas são degradadas pelas enzimas hidrolíticas fornecidas pela camada de aleurona e possivelmente pelo cotilédone e depois são conduzidas para o embrião.

Provavelmente as sementes são dispersas com o embrião não diferenciado ou não completamente desenvolvido, indicando um tipo de dormência morfológica, que junto com as características mencionadas anteriormente, determinam as estratégias desta espécie para o sucesso no estabelecimento das plântulas. Portanto, estas informações contribuem com o estudo da *V. friburgensis* var. *paludosa*, aplicado à conservação, propagação e ao manejo desta espécie.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCHÉ, J. D., OLMEDILLA, A., RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. **Análisis estructural del aparato fotosintético en plantas C4 y CAM mediante microscopía de fluorescencia/confocal.** Em: GONZALEZ R. J. L. & CHUECA A. C4 y CAM. Características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas. CSIC y Fundación Ramón Areces. Madrid, España. ISBN 978-84-00-09213-9, 2010.

ANACLETO, A. **Cultivo de bromélias e plantas ornamentais.** Ematerparaná. Guaratuba, Relatório técnico. 18 p, 2001.

ANASTÁCIO, M. R.; SANTANA, D. G. Características germinativas de sementes de *Ananas ananassoides* (Baker) L. B. Sm. (Bromeliaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, 32 (2): 195-200, 2010. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v32i2.1693

BELTRATI, C. M. & PAOLI, A. A. S. Semente. In: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 399-424, 2003.

BENNETT, B. C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZING, D. H. (Ed.). **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. London: Cambridge University Press, 2000.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. New York: Cambridge University Press, p. 690, 2000.

BENZING, D. H. Germination and early establishment of *Tillandsia circinnata* Schlecht. (Bromeliaceae) on some of its hosts and other supports in south Florida. **Selbyana**, 5: 95-106, 1978.

BETHKE, P., SCHUURINK, R. Y JONES, R. Hormonal signalling in cereal aleurone. **Journal of Experimental Botany**, 48(312): 1337-1356, 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds. Physiology of development and germination**. 2nd ed. New York, Plenum Press, 1994.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. 1. Development, germination, and growth. New York, Springer – Verlag. 307p, 1978.

BORGES E. E. L; RENA A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR I. B, PIÑA-RODRIGUES, F. C. M; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 350 p, 1993.

BORGES, E. E. L. **Comportamento bioquímico e fisiológico de sementes florestais nativas durante a embebição**. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 100 p., 2003.

BOUZON, Z. L. **Histoquímica e Ultraestrutura da Espermatogênese e Carposporogênese de Algas Gracilarióides (Rhodophyta)**. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 1999.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P. dos; TINÉ, M. A. S. Acúmulo de reservas. Em: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. ARTMED, Porto Alegre, 324 p, 2004a.

BUCKERIDGE, M. S.; REID, J. S. G. Major cell wall polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. **Ciência e Cultura**, 48: 153-162, 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P. dos; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry** 38:141-156, 2000.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H.P. dos; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. M. Mobilização de reservas. Em: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: o Básico ao Aplicado**. ARTMED, Porto Alegre, 324 p, 2004b.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. Em: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: o Básico ao Aplicado**. ARTMED, Porto Alegre, 324 p, 2004.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p, 2000.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: o Básico ao Aplicado**. ARTMED, Porto Alegre, 324 p, 2004.

DUARTE, E. F.; CARNEIRO, I. F.; REZENDE, M. H. Morfologia de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae). **Rev. Biol. Neotrop.** 6(1):1-12, 2009.

EAMES, A. J. **Morphology of the angiosperms**. New Delhi, Tata McGraw-Hill. 1974.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Trad. B. L. Morretes. 15. reimpr. Edgard Blüncher, São Paulo, 293 p, 2000.

ESAU, K. **Anatomia vegetal**. Barcelona, Ed. Omega S.A, 779 p. 1972.

FABRICIO, C. B. C. **Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos da Germinação de Sementes de Inajá (*Maximiliana maripa* (Aublet) Drude)**. Dissertação Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

FIORDI, A. C.; PALANDRI, M. R.; TURICCHIA, S.; TANI, G.; DI FALCO P. Characterization of the seed reserves in *Tillandsia* (Bromeliaceae) and ultrastructural aspects of their use at germination. **Caryologia**, 54(1): 1-16, 2001.

GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and citochemistry**. London: Academic Press. 301p. 1984

GEIER, T. PAS-positive reaction of phenolic inclusions in plant cell vacuoles. **Histochemistry**, 65 (2): 167-171, 1980. DOI: 10.1007/BF00493165

GORDON, E. M.; McCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: HARVEY, M. J. & MCLACHLAN, J. (eds) *Chondrus crispus*. Nova Scotian Institute of Science, Halifax. 111-133, 1973.

GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP (GPWG). Phylogeny and subfamilial classification of grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 88: 373-457, 2001.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, 589: 47-66, 2010.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2 ed. New York: Mcgraw Hill. 523p, 1940.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 472p. 2004.

KOSLOWSKI, T.T.; PALLARDY, G.G. Seed Germination and Seedling Growth. In: **Growth Control in Wood Plant**, San Diego: Academic Press, p.16-72, 1997.

LEME, E. M. C. **Canistrum. Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Salamandra, 108 p,1998.

MANSFIELD S. G.; BRIARTY L. G. The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. **Int. Journal Plant Science**, 157 (3): 280-295, 1996.

MANTOVANI, A.; IGLESIAS, R. R. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. **Rodriguésia**. 56 (87): 73-84, 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, 28: 892-896, 2005.

MOREIRA, B. A; WANDERLEI, M. G. L e BAROS, M. A. V. C. **Bromélias: importância ecológica e diversidade**. Taxonomia e morfologia. Curso de Capacitação de Monitores. São Paulo: Instituto de Botânica, 12p, 2006.

MOREL, G. M. & WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **Am. J. Bot.** 38:138-140, 1951.

MORRISON, I.N.; KUO, J; O`BRIEN, T.P. Histochemistry and fine structure of developing aleurone cells, **Planta** 123(2): 105-116, 1975. DOI: 10.1007/BF00383859

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), 67 (4):399-407, 2010.

MULLER, F. Die Keimung einiger Bromeliaceen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, 13(26): 175-182, 1895.

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

NAHOUM, P. Bromélia. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, 1: 1-40,1994.

O'BRIEN, T. P; FEDER, N. & MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. **Protoplasma**. 59: 39-52, 1964.

OURIQUES, L. C.; BOUZON, Z. L. Organização estrutural e ultra-estrutural das células vegetativas e da estrutura plurilocular de *Hincksia mitchelliae* (Harvey) P. C. Silva (Ectocarpales, Phaeophyceae). **Rodriguesia**, 59: 435-447, 2008.

PAIVA, E. A. S.; LEMOS-FILHO, J. L.; OLIVEIRA, D. M. T. Imbibition of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) Seeds: The Role of Stomata. **Annals of Botany** 98: 213–217, 2006.

PANT, D. D.; NAUTIYAL, D. D. Seed cuticles in some modern cycads. **Current Sci.** India. 31: 75-76. 1962.

PIERCE, S.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H.; WINTER, K. Hydrophobic trichome layers and epicuticular wax powders in Bromeliaceae. **American Journal of Botany** 88: 1371-1389, 2001.

POMPELLI, M. F. Germinação de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcarinioideae). **Floresta e Ambiente**, 13 (1): 1-9, 2006.

PORTER, K.; FEIG, Y. "The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora." **Limnology and Oceanography** 25(5): 943-948, 1980.

REID, J.S.G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenumgraecum* L. (Leguminosae). **Planta**, 100:131- 142, 1971.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica.** (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues, 559p, 1983.

RITCHIE, S.; MCCUBBIN, A.; AMBROSE, G.; KAO, T.; GILROY, S. The sensitivity of barley aleurone tissue to gibberellin is heterogeneous and may be spatially determined. **Plant Physiology** 120:361-370, 1999.

SANTOS, S. F. **Estrutura e histoquímica de sementes do gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae).** Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S.; COAN, A. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49 (6): 945-951, 2006.

SCHMIDT, E. C.; SANTOS, R.; HORTA, P. A.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. **Micron**, 41: 919-930, 2010.

SHERR E. B.; CARON, D. A.; SHERR, B. F. Staining of Heterotrophic protist for visualization via epifluorescence microscopy. En Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology, Kemp, P, Sherr B. F., Sherr, E. B., Cole, J., (eds) Lewis Publishers. 213-228, 1993.

SILVA T. R. G.; CORTELAZZO A. L ; DIETRICH S. M. C. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. **Revista Bras. Fisiologia Vegetal**, 10(2): 119-124, 1998.

SOUZA, L. A.; PAOLI A. A. S. Estrutura da semente. Em: Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação. SOUZA, L. A. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2009.

STEINMACHER, D. A. Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WERKER, E. **Seed anatomy.** Berlin, Gebrüder Borntraeger, 1997.

4. CAPÍTULO III: HISTODIFERENCIAÇÃO DE CULTURAS NODULARES A PARTIR DE SEMENTES E EXPLANTES FOLIARES EM *Vriesea*

RESUMO

A micropropagação baseada na indução, multiplicação e desenvolvimento de culturas nodulares, se configura em um modelo de eficiência regenerativa para as Bromeliaceae, as quais apresentam valor ornamental ou estão ameaçadas de extinção. Por tanto, objetivou-se induzir CN em sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* e em explantes foliares de *Vriesea reitzii* e caracterizar os aspectos morfo-histoquímicos durante a formação destes sistemas regenerativos. Foram coletadas sementes de frutos maduros de *V. friburgensis* var. *paludosa* que estavam iniciando sua abertura e posteriormente foram desinfestadas e inoculadas em meio de cultura MS líquido suplementado com diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento: ANA, BAP e 2IP. Para a indução de CN a partir de explantes foliares de *V. reitzii* foi usado o meio MS suplementado com ANA (4 µM) + BAP (2 µM). No caso das sementes, a suplementação de ANA (4µM) no meio de cultura resultou em 72% de indução de CN. Observou-se que primeiro o embrião inicia o processo de germinação, e após este processo dá início ao desenvolvimento das culturas nodulares. A partir da observação destes eventos pode-se inferir que a origem das CN a partir da semente está relacionada com os meristemas radicular e caulinar, e quando formadas a partir dos explantes foliares estão envolvidos os meristemas intercalar e marginal. Assim, estas informações ajudam a compreender as respostas morfogênicas nas bromélias, possibilitando a melhoria nos processos de micropropagação. **Palavras-chave:** cultura nodular, meristema apical, meristema intercalar, meristema marginal, meristema radicular, micropropagação.

ABSTRACT

The micropropagation based on induction, development and multiplication of nodule culture, is configured in a model of regenerative efficiency for the Bromeliaceae, which have ornamental value or are threatened of extinction. Therefore, we aimed at inducing NC from seed of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* and leaf explants of *Vriesea reitzii* and characterize the morphological and histochemical aspects during the formation of regenerative systems. Were collected

seeds from mature fruits of *V. friburgensis* var. *paludosa* that were beginning their opening and subsequently were sterilized and inoculated into liquid médium MS supplemented with different concentrations and combinations of growth regulators: NAA, 2iP and BAP. For the induction of NC from leaf explants of *V. reitzii* was used MS medium supplemented with NAA (4 mM) + BAP (2 mM). In the case of seeds, the supplementation of ANA (4 μ M) in the culture medium resulted in 72% induction of NC. It was observed that the embryo initiates the germination process and then the development of the NCs. From the observation of these events can be inferred that the origin of the CN from the seed is related to the stem and root meristems, and when formed from leaf explants are involved intermediate and marginal meristems. Thus, this information helps to understand the morphogenic responses in bromeliads, allowing the improvement in the process of micropropagation

Keywords: nodular culture, apical meristem, intercalary meristem, marginal meristem, root meristem, micropropagation.

4.1 INTRODUÇÃO

A regeneração ou morfogênese *in vitro* é o processo de formação de órgãos a partir de outros pré-existentes, podendo ocorrer através da embriogênese somática ou organogênese (GEORGE, 1996). Porém, é observado em bromeliáceas, um padrão de resposta da morfogênese *in vitro* que apresenta características diferenciadas a estes sistemas regenerativos tradicionais. Estes sistemas regenerativos foram definidos como culturas nodulares (CN), as quais apresentam alto potencial regenerativo, culminando na produção múltipla de brotos adventícios em condições de cultura adequadas (GUERRA e DAL VESCO, 2010). As culturas nodulares são aglomerados globulares meristemáticos de coloração verde clara e de textura friável ou levemente compacta e são definidas como uma rota morfogenética na cultura de tecidos vegetais (DAL VESCO e GUERRA, 2010). Esta rota morfogenética já foi descrita para as bromélias *V. friburgensis* var. *paludosa* (ALVES e GUERRA, 2001), *V. reitzii* (RECH FILHO et al., 2005; ALVES et al., 2006; RECH FILHO et al., 2009; DAL VESCO, 2010; DAL VESCO e GUERRA, 2010; GUERRA e DAL VESCO, 2010) e também em *Ananas comosus* (TENG, 1997; SCHERER, 2011).

Sistemas similares às CN descritos em bromélias foram reportados também em outras plantas como *Humulus lupulus* (Cannabaceae) (BATISTA et al., 2000; FORTES & PAIS, 2000;

FORTES et al., 2002), *Populus euphratica* (Salicaceae) (FERREIRA et al., 2009), *Decalepis hamiltonii* (Apocynaceae) (GIRIDHAR et al., 2004) e em *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) (MOYO et al., 2009), porém, receberam denominações diferentes, tais como, culturas nodulares organogênicas, nódulos organogênicos, calos nodulares e nódulos meristemáticos.

Uma das estratégias para a indução de CN em bromélias se baseia no uso de bases foliares (ALVES et al., 2006; RECH FILHO et al., 2009; DAL VESCO, 2010) e no uso de sementes (DAL VESCO, 2010). Deste modo, será determinada a homogeneidade genética, sendo que a utilização de sementes permite a conservação da diversidade genética e o uso de explantes somáticos derivados de uma planta mãe permite a produção de um grande número de plantas homogêneas a esta. Assim, Dal Vesco (2010) descreveu um modelo regenerativo baseado na indução, multiplicação e desenvolvimento de CN de *V. reitzii* que se configura em uma estratégia eficiente para a micropropagação em grande escala para esta e outras bromélias do gênero que apresentem potencial ornamental e/ou se encontrem ameaçadas de extinção.

Diante o exposto, o estudo do processo de formação das CN é importante com vistas a ampliar a compreensão da resposta morfogênica *in vitro* nas bromélias a fim de aumentar as possibilidades de sucesso nos procedimentos de micropropagação. Portanto, objetivou-se induzir CN em sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* e em explantes foliares de *Vriesea reitzii* e caracterizar os aspectos morfo-histoquímicos durante a formação destes sistemas regenerativos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

O meio de cultura usado foi constituído pela formulação de nutrientes minerais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), adicionado de vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951) e sacarose (30g L^{-1}), doravante denominado de meio MS básico (MSB). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 antes da esterilização em autoclave por 15 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1,3 atm de pressão. O material foi inoculado em tubos de ensaio com ponte de papel filtro contendo 15 ml de meio de cultura MSB líquido, mantido em sala de cultura com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de $50\text{-}60\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

4.2.2 Indução de cultura nodular a partir de Sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*

Foram coletados frutos maduros que estavam iniciando sua abertura, de plantas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, mantidas na coleção de bromélias do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina. Os frutos foram levados para o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal (LFDGV) para a extração e desinfestação das sementes, como foi descrito anteriormente (item 3.2.2). Em seguida, as sementes foram inoculadas no meio MSB líquido, suplementado com diferentes tipos e combinações de reguladores de crescimento descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações e combinações de reguladores de crescimento nos tratamentos para a indução das culturas nodulares a partir de sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*.

Tratamento	Reguladores de crescimento (μM)
T1	2 ANA
T2	4 ANA
T3	2 ANA + 2 BAP
T4	2 ANA + 4 BAP
T5	4 ANA + 4 BAP
T6	4 ANA + 2 BAP
T7	2 ANA + 8 2IP
T8	4 ANA + 8 2IP
T9	isento de reguladores de crescimento

Cada unidade experimental foi constituída de 5 tubos de ensaios contendo 5 sementes por tubo, em um delineamento experimental em forma de blocos completamente casualizados com três repetições. O tipo de dado coletado foi a porcentagem de indução de CN e de plântulas formadas a partir das sementes após 6 semanas de inoculação. Os dados de porcentagem foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias (Teste de Tukey ao nível de 5% de significância). A partir dos resultados deste experimento, selecionou-se o meio de cultura que apresentou maior indução de cultura nodular, para as posteriores análises morfo-histoquímicas.

4.2.3. Indução de cultura nodular a partir de explantes foliares de *Vriesea reitzii*

Foram utilizadas brotações jovens de $2,0 \pm 0,5$ cm de altura de *Vriesea reitzii*, pertencentes à Coleção de Bromélias *in vitro* do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Três folhas foram retiradas de cada broto, compreendidas entre 3ª e 6ª folha. Segmentos de bases foliares de 0,4 a 0,6 cm foram inoculados em meio MSB líquido suplementado com ANA (4 μM) + BAP (2 μM) previamente estabelecido por Dal Vesco (2010).

4.2.4 Caracterização morfológica da formação das culturas nodulares

Após a inoculação no meio de cultura para induzir CN nas sementes e nos explantes foliares, procedeu-se com avaliações diárias visando o acompanhamento da formação das CN. O registro fotográfico foi realizado com o auxílio do microscópio estereoscópico (Olympus SZH-ILLB), equipado com câmara clara (Olympus DP71).

4.2.5. Análise histoquímica da formação das culturas nodulares em microscópio de luz (ML)

Para a análise histoquímica foram coletadas do meio de cultura sementes e explantes foliares durante o processo de formação das culturas nodulares. O material foi fixado, desidratado e infiltrado seguindo os procedimentos descritos no capítulo 2 (item 3.2.3.). Secções longitudinais com 5 μm de espessura foram corados com diferentes testes histoquímicos: ATO, PAS e CBB. As lâminas foram secas ao ar e montadas com Bálsamo do Canadá. Aspectos relevantes foram identificados e fotografados usando câmara (Olympus DP71) acoplada ao microscópio (Olympus® BX-40).

4.2.6. Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As amostras para análise ao MEV das sementes e explantes foliares, foram preparadas e fotografadas como descrito no capítulo 2 (item 3.2.4).

4.2.7. Análise em microscópio confocal (MC)

Cortes longitudinais à mão livre das sementes e explantes foliares sem fixar, foram montados em lâminas, incubadas com DAPI e analisados como descrito no capítulo 2 (item 3.2.6).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Indução de cultura nodular a partir de explantes de semente *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*

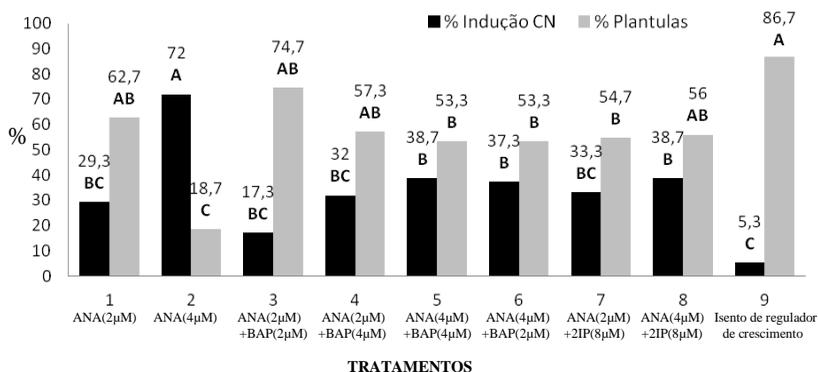
Após 6 semanas da inoculação das sementes todos os reguladores de crescimento avaliados nos tratamentos promoveram a indução de CN. A maior e mais significativa ($p < 0,001$) porcentagem de indução ocorreu em resposta ao tratamento T2 (ANA $4\mu\text{M}$) com 72% e a menor porcentagem no T9 (MSB isento de reguladores de crescimento) com 5,3%. Observou-se a diminuição na porcentagem de formação de plântulas nas sementes que induziam CN (Fig. 16; Fig. 17). Resultados similares foram encontrados em sementes de *V. reitzii* (DAL VESCO, 2010). Este autor encontrou entre vários tratamentos avaliados que o meio MSB suplementado com ANA ($4\mu\text{M}$) permitiu a maior indução de CN e o meio MSB isento de reguladores de crescimento apresentou a porcentagem menor. Porém, os efeitos da ANA na germinação de sementes em outras espécies de bromélias são variáveis. Pierik et al. (1984) encontraram em três espécies da subfamília Tillandsioideae (*Guzmania minor*, *Guzmania lingulata*, e *V. splendens*), que o meio suplementado com ANA em níveis de até $27\mu\text{M}$ não teve efeito sobre a germinação das sementes, no entanto, inibiu a germinação em níveis mais elevados. Em *Tillandsia reitzii*, o aumento das concentrações de ANA ($1,35\mu\text{M}$ até $5,37\mu\text{M}$) suplementada ao meio de cultura Knudson, inibiu o crescimento das plântulas (PICKENS et al., 2003). Pickens et al., (2006) observaram também em *T. reitzii* a inibição da germinação normal das sementes e a proliferação de calos e indução de gemas adventícias quando inoculadas em meio com BAP ($8,8\mu\text{M}$) + ANA $0,5\mu\text{M}$).

Segundo George (1996) as auxinas estão associadas ao crescimento e alongamento celular, enraizamento, iniciando o processo de divisão celular, formação de meristemas e manutenção da dominância apical. Chen (2001) verificou que tanto o processo de divisão, quanto de alongamento celular, ocorrem por meio de vias de sinalização distintas reguladas por auxinas, incluindo diferentes tipos de

proteínas. Estas vias de sinalização estão integradas para modular o processo de proliferação celular, garantindo o desenvolvimento da planta.

Além disso, a atividade fisiológica das auxinas depende não apenas daquelas adicionadas ao meio, mas também da AIA no interior dos tecidos cultivados e da interação entre os dois (PASQUAL et al., 2001). Nato et al. (2000) indicam que 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 celular. Conforme Beck (2005) a auxina tem um papel significativo no desenvolvimento das folhas seguintes à formação dos primórdios. Portanto, segundo Pasqual et al. (2008), os fatores que afetam os níveis naturais de AIA e atividade deste composto podem desse modo, ser importantes para controlar o crescimento e a morfogênese na cultura de tecidos de plantas usadas para micropropagação.

Figura 16. Porcentagem de indução de CN e de formação de plântulas a partir de sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* em diferentes meios de cultura, após 6 semanas de cultivo. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de significância.



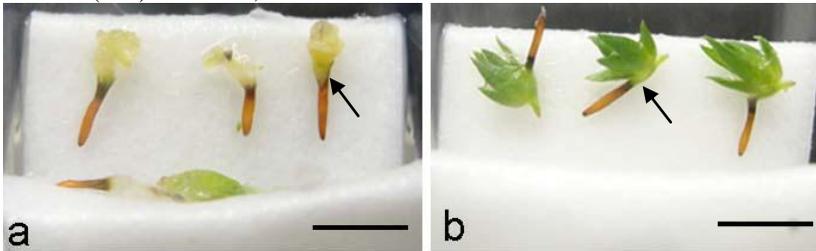
4.3.2. Caracterização morfológica e histoquímica da formação das culturas nodulares em semente de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*

Com os resultados obtidos no experimento anterior, selecionou-se o meio MSB suplementado com ANA (4µM) para realizar a caracterização da formação de CN a partir de sementes.

Na Figura 17, observa-se a formação das CN a partir das sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa*. A germinação iniciou após

três dias de inoculação no meio de cultura e posteriormente identificaram-se algumas diferenças quando comparadas com as sementes que formaram plântulas em meio MSB sem reguladores de crescimento, descrito nos capítulos um e dois desta dissertação. Na análise morfológica, as sementes inoculadas em meio MSB com ANA (4 μ M), mostraram no dia 12 uma inibição no crescimento da plântula, apresentando um tamanho menor que as plântulas no meio MSB (Fig. 18b). Isto também foi identificado na análise histoquímica, na qual se observou uma plântula com a forma mais globular. Além disso, identificou-se na região do ápice meristemático radicular um local de células mais densas e os primórdios foliares apresentaram algumas alterações. O segundo primórdio foliar apresentou-se com tamanho muito maior, ocasionado provavelmente pela alteração na divisão celular no meristema apical caulinar (Fig. 18c).

Figura 17. Sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* após 6 semanas de cultivo *in vitro*: **a)** No tratamento com ANA (4 μ M), observou-se o maior percentual de indução de CN (seta); **b)** Germinação de sementes em meio MSB isento de reguladores de crescimento. Observou-se a formação de plântulas normais (seta). **Barra:** 0,5mm



Apesar da presença do eofilo primário nas análises morfológicas do dia 18, foi evidente a inibição no crescimento da plântula e a identificação do início da formação das CN. A bainha cotiledonar emergida dos envoltórios seminais apresentou a perda de sua coloração esverdeada, mudando para uma coloração verde-amarelada (Fig. 18d). A avaliação histoquímica indicou uma grande proliferação de células que ocasionava a desintegração dos tecidos que formariam a plântula (Fig. 18e). Observou-se a origem de células de maior tamanho com forma arredondada e algumas com forma mais alongada que se tornaram mais desorganizadas e com maiores espaços intercelulares (Fig. 18f-g). Esta grande proliferação celular apresentou-se abaixo da camada da epiderme das estruturas emergidas ocasionando uma forma globular observada na

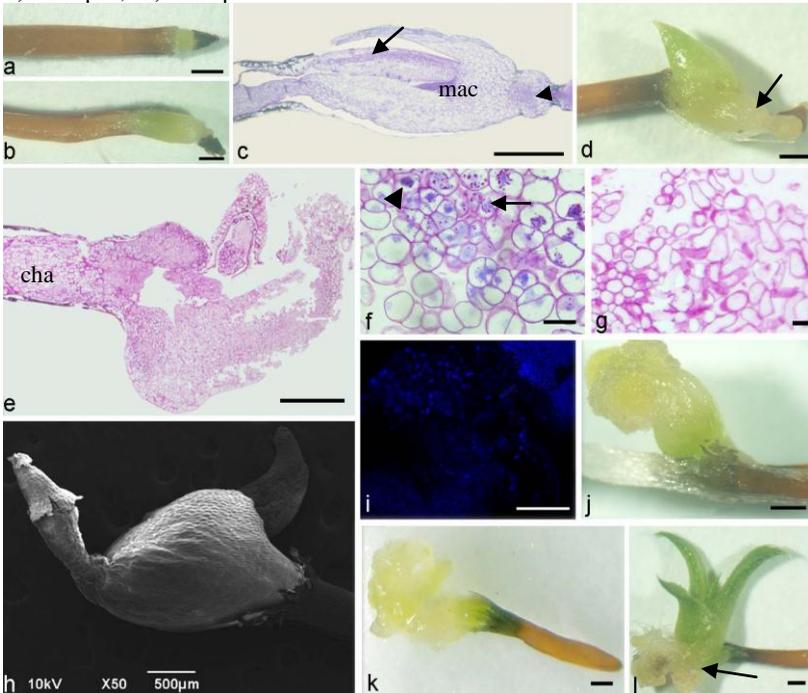
análise estrutural (MEV) onde as CN ainda não eram visíveis na superfície (Fig. 18h). Mediante o microscópio confocal observou-se uma intensa fluorescência com o fluorocromo DAPI (Fig. 18i), indicando células que contêm uma alta concentração de DNA (SHERR et al., 1993), que estaria relacionada à atividade mitótica durante os processos de divisão celular que posteriormente formariam as CN. Até o dia 18, a avaliação qualitativa da degradação do tecido de reserva nas sementes que induzem CN, apresentou-se similar ao observado nas sementes inoculadas em meio MSB que formavam plântulas normais (dados não apresentados).

Na análise morfológica do dia 28, observou-se a CN formada, a qual continuou com sua proliferação apresentando uma coloração amarela mais intensa na sexta semana de cultivo (Fig. 18j-k). Em algumas sementes observou-se a formação normal das plântulas e a posterior aparição das CN na base das primeiras folhas formadas (Fig. 18l). Em sementes de *V. reitzii* a indução das CN ocorreu mais cedo, observando-se a formação de CN, após duas semanas em cultivo (DAL VESCO, 2010). Na mesma espécie Rech Filho, et al (2005), observaram protuberâncias amarelas a verdes surgindo desde a região basal de explantes de plântulas cultivadas em meio MSB com ANA e BAP por 10 semanas.

A formação das CN a partir de sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* ocorreu após a semente germinar. Pompelli (2002), observou em sementes da bromélia *Dyckia distachya* em meio de cultura com a auxina 2,4D (5µM) primeiramente a germinação e depois a origem de uma estrutura calosa. No presente trabalho, presume-se que as regiões meristemáticas radicular e caulinar são os locais que geraram uma resposta para o início da formação das CN. Segundo McDaniel (1984), as células competentes dos tecidos vegetais, são reconhecidas pela resposta a um sinal externo que ativa um caminho de desenvolvimento específico. Esta competência está também associada à juvenildade dos tecidos e órgãos dos explantes (GAHAN & GEORGE, 2008). Desta forma, as células dos ápices meristemáticos mostraram-se competentes, uma vez que responderam ao meio indutivo com o aumento no processo de divisão celular. Segundo Mroginski et al. (2010), quanto mais jovem e indiferenciado se encontra o explante, melhor será sua resposta *in vitro*. Olmos et al. (2010), indica que os materiais que demonstram ter maior capacidade regenerativa são os obtidos de tecidos meristemáticos jovens, sejam gemas axilares ou adventícias, embriões ou sementes. Segundo Benzing (1980), meristemas inteiros ou uma porção destes, podem ser removidos das bromélias e propagados em culturas

assépticas, que em condições adequadas originam calos indiferenciados que posteriormente desenvolverão plântulas.

Figura 182. Indução de CN a partir de sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa* inoculadas no meio de cultura MSB suplementado com ANA (4 μ M): **a)** Dia 3 após a inoculação no meio, início da germinação; **b,c)** Dia 12, inibição do crescimento da plântula; **c)** Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, presença de células mais densas na região do ápice meristemático radicular (cabeça de seta) e o segundo primórdio foliar com grande tamanho (seta); **d-i)** 18^o dia após a inoculação no meio; **d)** Início da formação das CN a partir do meristema apical radicular (seta); **e)** Secção longitudinal submetida a PAS, observa-se a desintegração das estruturas da plântula com proliferação celular; **f)** Células em divisão, apresentando grão de amido (seta) e núcleos proeminentes (cabeça de seta); **g)** Novas células grandes e alargadas; **h)** Imagem em MEV, plântula com a forma globular; **i)** Imagem com luz ultravioleta (365 nm) em MC, usando DAPI em secções longitudinais do ápice radicular da plântula; **j)** Formação da CN após 28 dias de inoculação da semente no meio; **k)** Proliferação das CN após 6 semanas de cultivo; **l)** Formação de plântulas normais, formação das CN na base das primeiras folhas (seta). **cha:** cotilédone haustorial; **mac:** meristema apical de caule. **Barra:** **a-e)** = 500 μ m; **f,g)** = 25 μ m; **h)** = 200 μ m; **i-l)** = 500 μ m



4.3.3 Indução e caracterização morfológica e histoquímica da formação das culturas nodulares a partir de explantes foliares de *Vriesea reitzii*

O meio MSB suplementado com ANA (4 μ M) + BAP (2 μ M), induziu a formação das CN nos explantes foliares de *V. reitzii* (Fig. 19). Na análise morfológica, durante a primeira semana de inoculação ao meio de cultura, os explantes apenas apresentaram-se intumescidos (Fig. 19c). Porém, na análise histoquímica, observou-se o alongamento das células na região basal, mostrandose um avultamento mediante o MEV (Fig. 19d-e).

Na segunda semana, observou-se em alguns explantes o início das protuberâncias a partir da região basal (Fig. 19f). Observou-se uma proliferação de células adjacentes aos tecidos vasculares presentes no explante. Inicialmente, estas divisões celulares originavam células de maior tamanho, algumas com forma mais alongada que se tornavam desorganizadas e com maiores espaços intercelulares (Fig. 19h-i). A formação destas protuberâncias na base do explante também foi evidenciada nas imagens estruturais (Fig. 19j). Esta região apresentou maior fluorescência com o DAPI na microscopia confocal, indicando a maior atividade mitótica (Fig. 19g). Mercier et al. (2003), por meio de análise estrutural em explantes foliares de *Ananas comosus*, observaram um inchaço na região basal após 6 dias no meio de cultura indutivo e no dia 9 já identificaram-se várias protuberâncias nessa região.

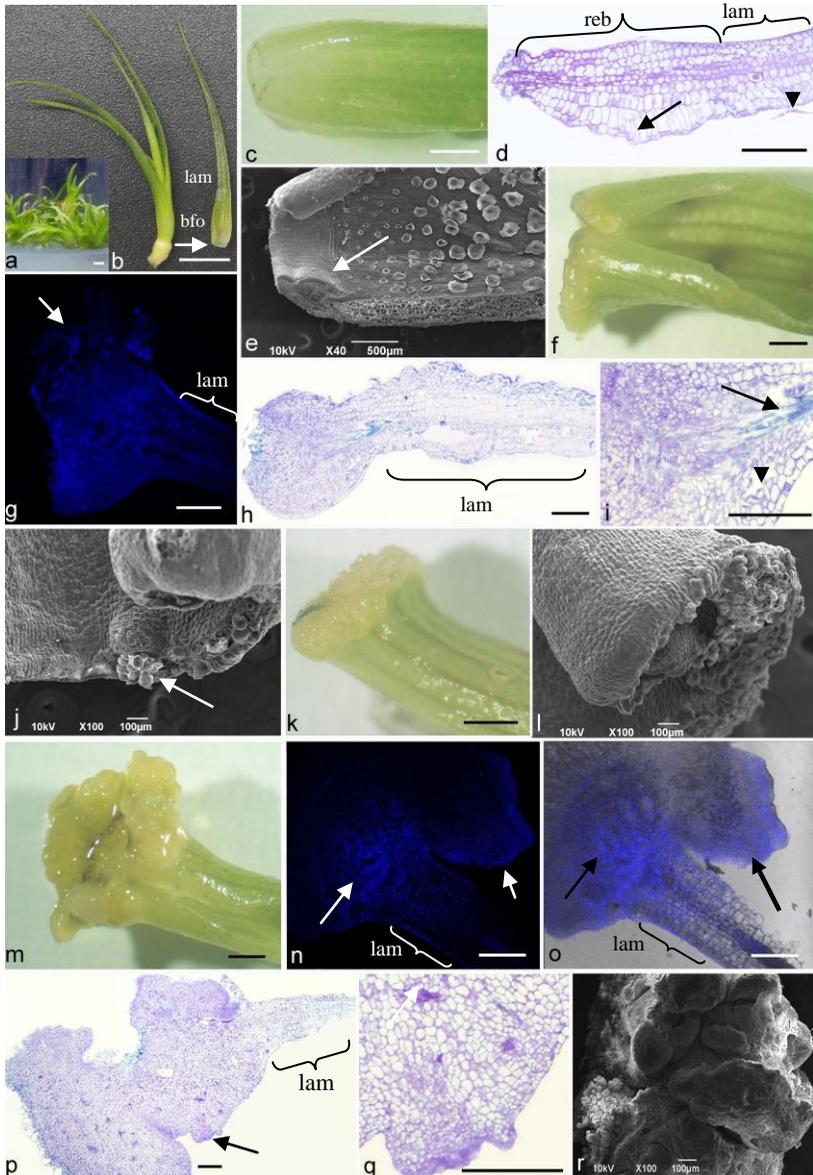
A proliferação de células continuou durante os dias seguintes, e na quarta semana na análise morfológica as CN apresentaram-se com novas protuberâncias originadas tanto da base do explante quanto das protuberâncias já formadas (Fig. 19k-m). Na microscopia confocal, observou-se maior fluorescência na base do explante, e também na borda das estruturas formadas, que indicam provavelmente as novas zonas meristemáticas em formação (Fig. 19n-o). Mediante as análises histoquímicas identificaram-se estruturas pré-nodulares, as quais, segundo Dal Vesco (2010) e Dal Vesco e Guerra (2010), posteriormente darão lugar aos microbrotos (Fig. 19p-q). Segundo estes autores, no padrão de desenvolvimento das CN, apresenta-se a formação de uma zona meristemática na região subepidérmica das CN, que desenvolvem estruturas pré-nodulares que evoluíram para meristemas caulinares, e posteriormente a regeneração de microbrotos.

A formação das CN na região basal dos explantes foliares em *V. reitzii*, também foi obtida por Alves et al. (2006), Rech Filho et al. (2005, 2009), Dal Vesco e Guerra, (2010), Dal Vesco, (2010). A

formação de estruturas similares nesta região do explante, também foi observada em outras espécies de bromélias, como *Dickia macedoi* (MERCIER e KERBAUY, 1993); *Neoregelia cruenta* (CARNEIRO et al, 1999); *V. friburgensis* var. *paludosa* (ALVES & GUERRA, 2001) e *Ananas comosus* (MERCIER et al, 2003; FIROOZABADY e MOY, 2004; SCHERER, 2011).

Quando a folha jovem é destacada do microbroto para obter o explante, esta se compõe da lâmina foliar, bainha foliar e meristema intercalar o qual fica na região mais basal (Fig. 19b). Mediante a análise em MEV, na região mais basal do explante, não foram encontrados tricomas. Observou-se tricomas em formação e posteriormente em grandes quantidades na parte superior do explante. O fato de este tecido não ser diferenciado na base foliar, pode confirmar a presença do meristema intercalar neste explante.

Figura 19. Indução de CN em explantes foliares de *V. reitzii* inoculadas no meio de cultura MSB suplementado com ANA (4µM) e BAP (2 µM): **a)** Microbroto in vitro para a obtenção dos explantes; **b)** Folha jovem retirada do microbroto apresentando meristema intercalar na base (seta); **c-e)** Segmento do explante foliar depois de uma semana no meio de cultura; **d)** Seção longitudinal submetida a ATO, observa-se o alongamento das células na base do explante (seta); **e)** Imagem em MEV observa-se a base do explante sem tricomas (seta); **f-j)** formação de protuberâncias na base do explante foliar depois de duas semanas no meio de cultura; **g)** Seção longitudinal com luz ultravioleta (365 nm) em MC, usando DAPI, observa-se células alongadas no extremo da protuberância (seta); **h)** Seção longitudinal submetida a ATO, **i)** Detalhe da proliferação de células e a desdiferenciação dos tecidos vasculares (seta), células de maior tamanho alongadas com maiores espaços intercelulares (cabeça de seta); **j)** Imagem em MEV, observa-se a presença de células alongadas no extremo da protuberância (seta); **k-l)** Proliferação das CN na semana três no meio de cultura; **l)** Imagem em MEV; **m-q)** Proliferação das CN na semana quatro no meio de cultura; **n-o)** Seção longitudinal com luz ultravioleta (365 nm) em MC, usando DAPI; **o)** imagem em campo claro. Observa-se maior fluorescência na base do explante, e nas novas zonas meristemáticas em formação (seta); **p-q)** Seção longitudinal submetida a ATO. Observa-se estruturas pré-nodulares (seta); **q)** detalhe das estruturas; **r)** Imagem em MEV. **lam:** lamina foliar; **bfo:** Bainha foliar; **reb:** região basal do explante; **tri:** tricoma. **Barra:** **a, b)**= 5mm; **c, f, k, m)**= 1mm; **d, g, h, i, n, o, p, q)**= 250µm



Segundo Menezes et al (2006), nas angiospermas os meristemas apical, marginal e intercalar funcionam simultânea ou sequencialmente para promover o crescimento da folha. Os meristemas marginais localizados ao longo da margem de um primórdio foliar são os

formadores da lâmina e consistem de uma fila de iniciais marginais, de iniciais sub-superficiais e das derivadas imediatas (Esau, 2000). No entanto, são de vida curta subsequente à atividade meristemática intercalar e difusa. Já o meristema intercalar refere-se ao tecido derivado do meristema apical que continua a sua atividade meristemática a certa distância do mesmo. Porém, o meristema intercalar não contém células que podem ser chamadas iniciais (Evert 2006). Nas monocotildôneas, as zonas de crescimento denominadas meristemas intercalares estão principalmente localizadas na base da lâmina e da bainha (Esau, 2000). Segundo Benzing (1980), nas bromélias apresenta-se como uma faixa de tecido embriogênico localizado na base de cada folha imatura, que vai gerar os tecidos foliares. Portanto, a resposta na indução de CN a partir de explantes foliares neste trabalho, pode estar relacionada tanto com a presença do meristema intercalar quanto do meristema marginal, os quais provavelmente não apresentam um controle gênico tão forte como o meristema apical, favorecendo assim, a competência regenerativa. Hosoki e Asahira, (1980), sugeriram que o alto potencial de regeneração em explantes foliares é atribuído à presença de um meristema intercalar axilar na região basal das folhas de bromélias. Firoozabady e Moy, (2004), testaram em *Ananas comosus* várias secções da folha (ponta, meio e base) e apenas as bases das folhas foram responsivas a processos morfogênicos e as outras secções desencadearam processos de senescência. Estes autores sugeriram que esta resposta está relacionada com a proximidade ao meristema intercalar ou à presença de células com divisão rápida. Koh e Davies (1997) conseguiram a micropropagação de bromélias do gênero *Cryptanthus* mediante explantes de folha com os meristemas intercalares adjuntos obtidos de plantas mantidas em viveiros. Na palmeira *Bactris gasipaes*, Steinmacher et al., (2007), observaram que as bainhas foliares na região mais próxima do meristema apical revelaram maior competência regenerativa, neste caso embriogênica.

Nas análises histoquímicas das CN da *Vriesea reitzii*, Dal Vesco e Guerra, (2010) observaram que as características da proliferação das CN até a regeneração de microbrotos estão indicadas pela existência de três diferentes camadas de células: 1) camada central composta por um grupo maior de células de diferentes tamanhos e não organizadas; 2) na região mais externa um grupo de pequenas células mais adensadas e isodiamétricas, denominado de zona meristemática e; 3) região externa com a formação da protoderme. Subsequentemente, estes processos evoluem para a formação de estruturas globulares múltiplas, seguido da formação de meristemas caulinares e o desenvolvimento de microbrotos.

A partir das observações da formação das CN a partir de sementes e explantes foliares no presente trabalho, observou-se uma alta divisão celular, que primeiro gera células alongadas e desorganizadas, as quais estariam relacionadas com a primeira camada de células descrita anteriormente por Dal Vesco e Guerra (2010). Posteriormente começa a ser gerada a segunda camada, destacada pelo grupo de pequenas células mais adensadas e isodiamétricas, como foi claramente observado na indução das CN em explantes foliares. Já a origem da protoderme, nas CN, poderia estar relacionada com a camada epidérmica contínua do explante original.

Diante o exposto, e a partir das análises realizadas, presume-se que a origem das CN ocorre a partir de regiões meristemáticas ou de tecidos próximos recém desenvolvidos com células de divisão rápida. Assim, a origem das CN seria do meristema radicular e caulinar quando formadas a partir de sementes ou do meristema intercalar e marginal, quando formadas a partir de explantes foliares. No entanto, Alves et al., (2006) induziram CN em segmentos foliares de *V. reitzii* com MSB suplementado com 2,4-D (20 μ M) e Kin (1 μ M) e descreveram o desenvolvimento das CN iniciando a partir do tecido parenquimático após 3 semanas em cultivo. Da mesma forma, Batista et al. (2000), observaram a indução de nódulos organogênicos, a partir de centros organizados de cinco camadas de células meristemáticas da área central de vascularização em segmentos de pecíolo de *Humulus lupulus*.

4.4 CONCLUSÃO

As taxas de indução das culturas nodulares observadas a partir de sementes estão associadas, às concentrações e combinações de cada regulador de crescimento testado. Assim, a presença de ANA (4 μ M) no meio de cultura foi essencial para alcançar 72% de indução de CN a partir de sementes de *V. friburgensis* var. *paludosa*. No entanto, primeiro o embrião inicia o processo de germinação, e após este processo dá início o desenvolvimento das CN.

Na *Vriesea*, provavelmente a formação das CN a partir da semente está relacionada com os meristemas radicular e caulinar, e quando formadas a partir dos explantes foliares estão envolvidos os meristemas intercalar e marginal. Estas células meristemáticas mostram-se competentes e geram uma resposta no meio indutivo originando as CN. Assim, estas informações ajudam a compreender as respostas morfogênicas nas bromélias, possibilitando a melhoria nos processos de micropropagação.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Hort.** 110: 204–207, 2006.
- ALVES, G. M.; GUERRA, M. P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **J. Bromeliad Soc.** 51(5): 202-212, 2001.
- BATISTA, D.; ASCENSÃO L.; SOUSA, M. J.; PAIS, M. S. Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. *Eroica* in liquid medium from organogenic nodule cultures. **Plant Sci. Shannon**, 151: 47–57, 2000.
- BECK C.B. **An introduction to plant structure and development.** Cambridge University Press, New York, 431 p, 2005.
- BENZING, D.H. 1980. **The biology of Bromeliads.** Eureka, Mad River Press.
- CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G. J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J. & MANSUR, E. In vitro regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 55: 79-83, 1999.
- CHEN, J. Dual auxin signaling pathways control cell elongation and division. **J. Plant Growth Reg.**, 20: 255-264, 2001.
- DAL VESCO, L. L. **Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da mata atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): bases para a conservação e propagação massal.** Tese Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.
- DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. **Scientia Hort.** 125: 748-755, 2010.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Trad. B. L. Morretes. 15. reimpr. Edgard Blücher, São Paulo, 293 p, 2000.

EVERT, R. F. **Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development**. 3th ed Wiley, 607p, 2006.

FERREIRA, S.; BATISTA, D. SERRAZINA, S. PAIS, M. S. Morphogenesis induction and organogenic nodule differentiation in *Populus euphratica* Oliv. leaf explants. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 96: 35–43, 2009.

FIROOZABADY, E.; MOY, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, 40: 67–74, 2004.

FORTES, A. M.; PAIS, M. S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. *Nugget* (Cannabinaceae): histological studies and changes in the starch content. **Am. J. Bot.**, 87 (7): 971–979, 2000.

FORTES, A. M.; TESTILLANO, P. S.; RISUEÑO, M. DEL C.; PAIS, M. S. Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. *Nugget*. **Physiol. Plant.**, 116: 113–120, 2002.

GAHAN, P. B.; GEORGE. E. F. Adventitious Regeneration. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3a. Edição, Springer, p.355-401, 2008.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: The Technology. Wilts: Exegetics, Part. 1, 575-1333, 1996.

GIRIDHAR, P.; KUMAR, V.; RAVISHANKAR, G. A. Somatic embryogenesis, organogenesis, and regeneration from leaf callus culture of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., an endangered shrub. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, 40: 567-571, 2004.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in**

Molecular Biology. New York: Humana Press-Springer, 589: 47-66, 2010.

HOSOKI, T. & ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience** 15(5): 603-604, 1980.

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

MENEZES, N, L.; SILVA, D. C.; PINNA G. F. A. M. Folha. Em: APPEZZATO-DA-GLORIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal.** Edição revista e atualizada. 2ª ed., Editora UFV, Viçosa, 438p, 2006.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* –an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Bot. Gard. Microprop.** News 1:70–72, 1993.

MERCIER, H.; SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; HAMASAKI, R. M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Braz. J. Plant Physiol.**, 15(2):107-112, 2003.

MOREL, G. M. & WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **Am. J. Bot.** 38:138-140, 1951.

MOYO, M., FINNIE, J.F. VAN STADEN, J. *In vitro* morphogenesis of organogenic nodules derived from *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* leaf explants. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, 98: 273-280, 2009.

MROGINSKI, M.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Em: **Biotecnología y mejoramiento vegetal II.** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. Buenos Aires, 650 p. 2010.

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

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO E. Micropropagación Em: **Biotecnología y mejoramiento vegetal II**. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. Buenos Aires, 2010. 650 p. 2010.

PASQUAL, M.; SANTOS F.C.; FIGUEIREDO M.A.; JUNQUEIRA K.P.; REZENDE J.C; FERREIRA E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, 26: 045-049, 2008.

PASQUAL, M; HOFFMANN A; RAMOS J. D. **Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações**. Introdução: Situação e Perspectivas. Lavras: UFLA/FAEPE. 72 p. 2001.

PICKENS, K. A.; AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y.; WOLF, J. H. D. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. **HortScience**, 38: 101–104, 2003.

PICKENS, K. A.; WOLF, J.; AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, 42: 348–353, 2006.

PIERIK R.L.M; STEEGMANS H.H.M; HENDRIKS J. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of *in vitro* cultivated seedling of Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**. 24: 193-199, 1984.

POMPELLI, M. F. **Morfogênese *in vitro*, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachya* Hassler**. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 93p., 2002.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MÜLLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biod. Conserv.** 14: 1799-1808, 2005.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO L.L.; GUERRA, M.P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic Forest. **Ciência Rural**, 39 (3): 909-912, 2009. Doi: 10.1590/S0103-84782008005000088.

SCHERER, R. F. **Inovações em sistemas de micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) e caracterização genética de variedades crioulas do estado de Santa Catarina.**

Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SHERR E. B.; CARON, D. A.; SHERR, B. F. **Staining of Heterotrophic protist for visualization via epifluorescence microscopy.** En Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology, Kemp, P, Sherr B. F., Sherr, E. B., Cole, J., (eds) Lewis Publishers. 213-228, 1993.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A.C.M.; STEFENON, V.M.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany** 100:699–709, 2007.

TENG, W. L. An alternative propagation method of Ananas through nodule culture. **Plant Cell Rep**, 16: 454–457, 1997.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo contribuiu para a ampliação da base de conhecimentos sobre as bromélias nativas da Mata Atlântica, especialmente nos processos de estabelecimento das plântulas relacionados com a germinação e o desenvolvimento pós-seminal e relacionados à propagação *in vitro* mediante o sistema regenerativo das culturas nodulares. Para tanto, as análises morfológicas e histológicas, realizadas mediante o uso de microscopia óptica e eletrônica, foram fundamentais na identificação e caracterização das estruturas durante os processos avaliados.

Apresentam-se informações a respeito do processo de germinação e formação da plântula, usando a espécie *V. friburgensis* var. *paludosa*, a qual serve como modelo para as espécies mais próximas, que apresentem um maior risco de extinção, visto que as informações sobre estes aspectos histoquímicos para o gênero *Vriesea* não foram encontradas na literatura.

Contudo, ressalta-se a necessidade de pesquisas mais específicas, relacionadas, por exemplo, à dormência morfológica nas sementes, mobilização de polissacarídeos de reserva de parede, caracterização quantitativa das reservas e sua contribuição na germinação e no estabelecimento da plântula, estudos da ultra-estrutura dos diferentes tipos de células (do embrião, do cotilédone, dos meristemas, das CN), entre outros, a fim de possibilitar um maior conhecimento da biologia das bromélias e o aprimoramento dos protocolos de propagação que promovam a preservação do patrimônio genético e da biodiversidade deste grupo de plantas.