



## Baixas concentrações de macronutrientes beneficiam a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, Brasil

*Low macronutrient concentrations benefit in vitro propagation of Vriesea incurvata (Bromeliaceae), an endemic species of the Atlantic Forest, Brazil*

Márcio Hisayuki Sasamori<sup>1</sup>, Delio Endres Júnior<sup>1</sup> & Annette Droste<sup>1,2</sup>

### Resumo

A cultura *in vitro* é uma ferramenta eficiente para a propagação de plantas de importância ecológica e econômica e permite o entendimento acerca de aspectos ecofisiológicos das espécies. Este estudo teve por objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de macronutrientes sobre o desenvolvimento *in vitro* e a sobrevivência *ex vitro* de plântulas de *Vriesea incurvata*, visando à conservação desta bromélia epifítica endêmica da Floresta Atlântica. A germinação *in vitro* foi avaliada aos 60 dias e as plântulas foram cultivadas por 180 dias em meio MS com 25 ou 50% dos macronutrientes, 25 ou 50% dos sais nitrogenados, bem como com 100% da formulação original do meio. As sementes apresentaram 95% de germinação. Em todos os tratamentos, houve 100% de sobrevivência das plântulas cultivadas *in vitro*. A redução de todos os macronutrientes ou dos sais nitrogenados mostrou-se benéfica, proporcionando maior comprimento da parte aérea e da raiz maior, maior número de folhas e de raízes, bem como maior massa fresca, além de ter propiciado 97% de sobrevivência das plântulas aclimatizadas *ex vitro*. Os dados obtidos permitem o estabelecimento de um protocolo de propagação *in vitro* de *V. incurvata*, com o objetivo de sua futura reintrodução no habitat natural.

**Palavras-chave:** bromélias, conservação, micropropagação, nutrição mineral.

### Abstract

*In vitro* culture is an efficient tool for the propagation of plants of ecological and economic importance and allows the understanding about ecophysiological aspects of the species. The objective of this study was to assess the influence of different macronutrient concentrations on *in vitro* development and *ex vitro* survival of *Vriesea incurvata* plantlets, aiming the conservation of this endemic epiphytic bromeliad from the Atlantic Forest. The *in vitro* germination was assessed at 60 days and the plantlets were cultivated for 180 days on MS medium with 25 or 50% of the macronutrients, 25 or 50% of the nitrogen salts, or with 100% of the original formulation of the medium. The seeds showed 95% germination. In all treatments, there was 100% survival of *in vitro* cultivated plantlets. The reduction of all macronutrients or of the nitrogen salts was beneficial, and permitted a greater length of the aerial part and of the major root, a higher number of leaves and roots, and more fresh mass, as well as allowed 97% survival of *ex vitro* acclimatized plantlets. The obtained data allow the establishment of a protocol for *in vitro* propagation of *V. incurvata*, aiming its future reintroduction into the natural habitat.

**Key words:** bromeliads, conservation, micropropagation, mineral nutrition.

### Introdução

A Floresta Atlântica ocupa uma área de 1.315.460 km<sup>2</sup> (Fundação SOS Mata Atlântica 2015) ao longo da costa litorânea do território brasileiro, que se estende do Rio Grande do Norte

ao Rio Grande do Sul (IBF 2015). Conhecido mundialmente como uma das áreas prioritárias para conservação (Myers *et al.* 2000), este bioma tem registrado crescente redução de sua cobertura vegetal (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE

<sup>1</sup> Universidade Feevale, Prog. Pós-graduação em Qualidade Ambiental, Rod. ERS-239 2755, 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Autor para correspondência: annette@feevale.br

2014), atualmente restando apenas 7,91% de sua área original (IBF 2015). Bromeliaceae apresenta distribuição neotropical, com 58 gêneros e 3.248 espécies descritas (Luther 2010), das quais 40% são encontradas no território brasileiro (BFG 2015), sendo a segunda maior família de epífitos vasculares ocorrentes na Floresta Atlântica (Kersten 2010). As bromélias são consideradas um grupo taxonômico importante devido aos altos níveis de especialização, formando sistemas ecológicos complexos que contribuem para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais (Padilha 1978; Benzing 2000). Várias espécies desta família são endêmicas da Floresta Atlântica (Wanderley *et al.* 2006; Martinelli *et al.* 2008), e muitas figuram nas listas de espécies ameaçadas de extinção devido ao extrativismo e à degradação ambiental pela intervenção antrópica (Reitz 1983; Forzza *et al.* 2013).

*Vriesea incurvata* Gaudich. é uma bromeliácea endêmica do Brasil, ocorrente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (BFG 2015). No Rio Grande do Sul, *V. incurvata* figura na lista de espécies da flora ameaçadas de extinção, na categoria de dados insuficientes para avaliação de seu risco (Rio Grande do Sul 2014) e no Paraná é uma das dez bromeliáceas mais coletadas ilegalmente e comercializadas para ornamentação (Negrelle & Muraro 2006). A espécie é herbácea, de hábito epifítico, raramente rupícola, com altura máxima de 50 cm, apresentando cerca de 10 folhas, dispostas em roseta, lisas e sem espinhos (Reitz 1983). A sua inflorescência é submultifloral, espigada, com altura entre 30 a 40 cm (Negrelle & Muraro 2006) (Fig. 1f). Geralmente, *V. incurvata* é encontrada na parte mediana inferior dos forófitos, preferencialmente em ambiente de luz difusa (Reitz 1983), de forma isolada ou em pequenos agrupamentos formados por brotações laterais, no interior do sub-bosque e em beiras de cursos d'águas (Bourscheid 2008).

As sementes produzidas pelas bromélias epifíticas apresentam baixa capacidade de germinação em ambiente natural (Mekers 1977; Mercier & Kerbauy 1995), uma vez que necessitam de condições adequadas específicas de microclima e substrato (Winkler *et al.* 2005). Além disso, o estabelecimento das plântulas nos anos iniciais tem sido considerado o estágio mais vulnerável do ciclo de vida das bromélias, levando a altas taxas de mortalidade das plântulas (Harper 1977; Winkler

*et al.* 2005). O uso de ferramentas biotecnológicas é uma alternativa importante para a conservação de espécies (Grattapaglia & Machado 1998), uma vez que a cultura *in vitro* permite elevadas taxas de germinação das sementes de forma rápida e eficiente quando comparada ao ambiente natural (Mercier & Kerbauy 1995; Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009), além de proporcionar a manutenção da variabilidade genética das plântulas (Mercier & Kerbauy 1995; Pinto *et al.* 2010). Contudo, a maioria dos estudos de micropropagação de bromeliáceas utilizam reguladores de crescimento para indução e multiplicação de brotos, gerando indivíduos geneticamente homogêneos, inadequados para fins conservacionistas.

A micropropagação, em função da disponibilidade de água e nutrientes, bem como das condições livres de patógenos, apresenta vantagens quando comparada com as propagações convencionais (Fay 1994; Engelmann 1997; Kozay *et al.* 1997; Thorpe & Harry 1997). Para alcançar o sucesso da cultura *in vitro*, são necessários requisitos essenciais para o ótimo estabelecimento das plântulas, sendo fundamental a concentração de nutrientes no meio de cultura, uma vez que cada espécie apresenta comportamento diferenciado no seu desenvolvimento devido às características genéticas (Kozay *et al.* 1997; Fortes & Pereira 2001). Um dos meios mais empregados para a propagação *in vitro* de diversas espécies vegetais é o meio MS (Murashige & Skoog 1962), considerado um substrato nutritivo rico em sais minerais. Porém, o excesso de nutrientes minerais e, especialmente, de sais nitrogenados no meio de cultivo pode ser prejudicial para as plântulas micropropagadas (Sakuta *et al.* 1987; Avila *et al.* 1998; Cazetta *et al.* 1999; Ali *et al.* 2000). Por outro lado, diluições do meio MS têm sido efetivas para micropropagação de plântulas (Grattapaglia & Machado 1998), como demonstrado em estudos de bromélias (Mercier & Kerbauy 1994; Endres & Mercier 2001b; Tamaki *et al.* 2007; Kurita *et al.* 2014; Martins *et al.* 2015) e orquídeas (Stancato & Faria 1996; Unemoto *et al.* 2007; Sorace *et al.* 2008; Endres Júnior *et al.* 2014).

Após a cultura *in vitro*, as plântulas precisam ser transferidas para a condição *ex vitro*. Durante esta fase, condições abióticas como a umidade relativa do ar, a intensidade luminosa e a troca de gases sofrem grandes alterações, sendo fatores limitantes para a sobrevivência das plântulas (Lakso *et al.* 1986). Dessa forma, a exposição gradual durante o processo de aclimatização das

plântulas ao ambiente externo permite aumentar a sobrevivência dos indivíduos (Grattapaglia & Machado 1998), facilitando o estabelecimento das plântulas em ambiente *ex vitro*, para posterior utilização em programas de conservação de espécies ameaçadas, por meio da reintrodução no ambiente natural (Benson 1999).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de macronutrientes sobre o desenvolvimento *in vitro* e a sobrevivência *ex vitro* de plântulas de *V. incurvata* Gaudich., visando à conservação desta bromélia epifítica endêmica da Floresta Atlântica.

## Material e Métodos

### Obtenção, desinfestação e semeadura das sementes

Cápsulas maduras de *Vriesea incurvata* foram coletadas de indivíduos de uma população estabelecida no trecho superior da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, no município de Caraá, na região litoral norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Após lavagem em água corrente com detergente comercial e enxágue em água destilada por três vezes, as cápsulas foram levadas à câmara de fluxo laminar, onde foram esterilizadas por 30 segundos em álcool etílico 70% e, em seguida, submersas em hipoclorito de sódio 4% acrescido de 0,1% de detergente Tween® 20 por 15 minutos. Após, as cápsulas foram lavadas quatro vezes em água destilada autoclavada e abertas com auxílio de bisturi, para a retirada das sementes (Droste *et al.* 2005). As sementes tiveram os apêndices plumosos retirados e foram semeadas em placa de petri com 30 mL de meio MS (Murashige & Skoog 1962) para germinação, conforme descrito por Bencke & Droste (2008; Fig. 1a). As culturas permaneceram em condições controladas, com intensidade luminosa de 60  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 26  $\pm$  1°C durante 60 dias. Após este período, o número de sementes germinadas foi registrado.

### Experimento com diferentes concentrações de macronutrientes

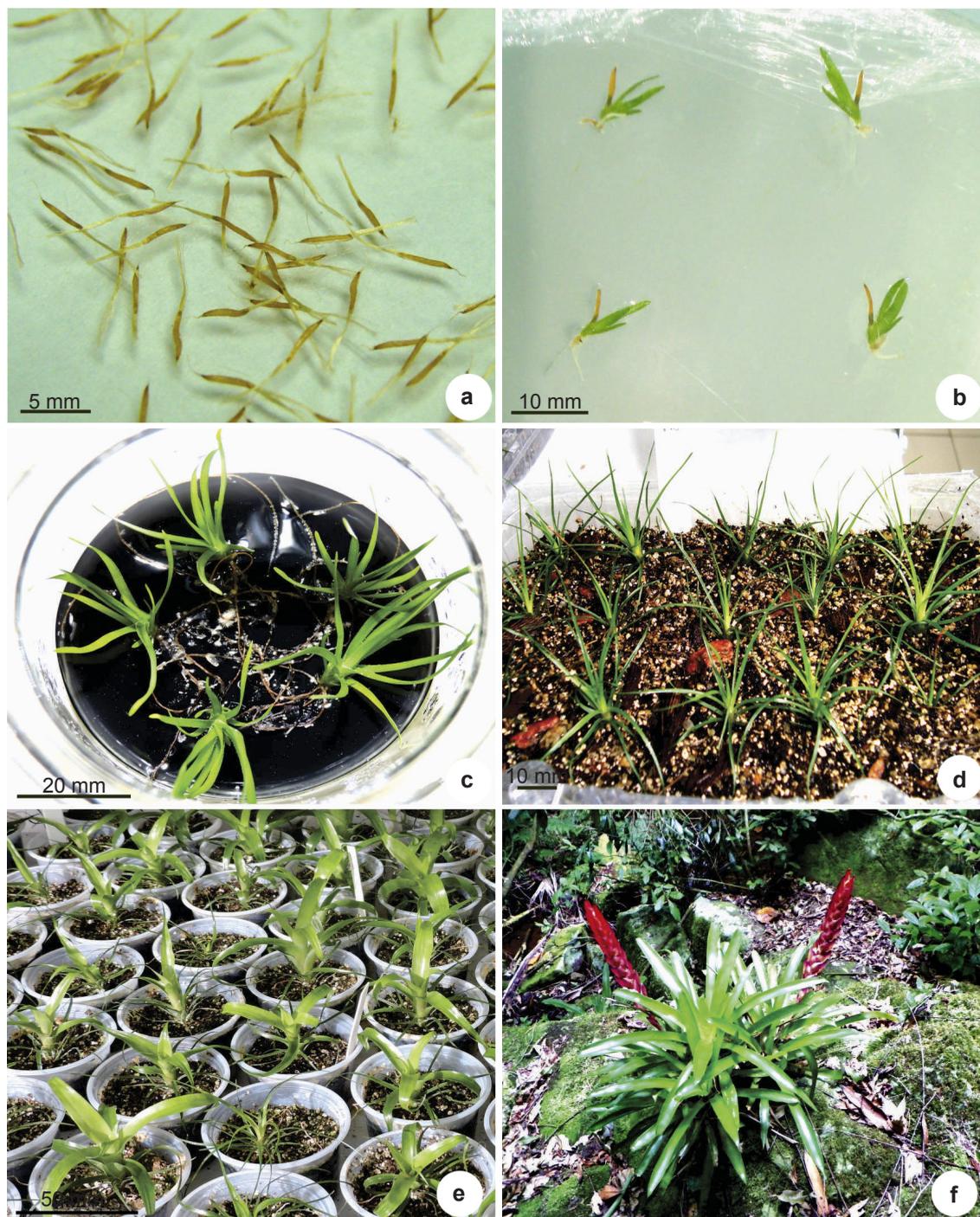
Plântulas com 1,0  $\pm$  0,2 cm de altura (Fig. 1b) foram cultivadas em frascos contendo 30 mL de meio MS, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™, 5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e pH ajustado em 6,4 antes da esterilização em autoclave. A formulação completa dos sais do meio MS (meio denominado 100MS) foi utilizada como referência

e os demais tratamentos consistiram na redução das concentrações dos macronutrientes (25 e 50%: meios denominados 25M e 50M, respectivamente) ou apenas dos sais nitrogenados (25 e 50%: meios denominados 25N e 50N, respectivamente; Tab. 1). Para cada tratamento, foram cultivados 70 indivíduos, distribuídos em grupos de cinco em 14 frascos (volume 200 mL) totalizando 350 plântulas (Fig. 1c). A cada 60 dias, foi realizado um sub-cultivo e, ao término de 180 dias, foram mensurados comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da raiz maior (CRM) e massa fresca (MF) de cada indivíduo.

Após o registro dos dados relativos aos parâmetros morfológicos acima, as plântulas foram submetidas à aclimatização conforme metodologia descrita por Sasamori *et al.* (2014), sendo plantadas em grupos de 15 indivíduos em substrato comercial (Carolina Soil®, a base de turfa e vermiculita) em duas bandejas plásticas transparentes com tampa (24 cm  $\times$  18 cm, 10 cm de altura) por tratamento. As plântulas permaneceram em aclimatização no laboratório, sob temperatura controlada (26  $\pm$  1°C) e com retenção de 70% da luz natural por meio da tela de polipropileno. As bandejas permaneceram fechadas com as tampas transparentes por 30 dias, para proporcionar maior umidade junto às plântulas e posteriormente a este período, as bandejas foram abertas gradualmente para expor os indivíduos em contato com o ar atmosférico. A irrigação das plântulas foi realizada manualmente, mantendo o substrato sempre úmido e as adubações foliares foram realizadas quinzenalmente com o fertilizante comercial Peter® profissional (1 g L<sup>-1</sup>). As plântulas permaneceram em aclimatização por um período de 150 dias (Sasamori *et al.* 2014), sendo registrados os dados de sobrevivência dos indivíduos provindos de cada tratamento *in vitro* (Fig. 1d,e).

### Análise estatística

Os dados de sobrevivência das plântulas aclimatizadas foram transformados em porcentagens. Os dados dos parâmetros morfológicos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, ao nível de 5% de probabilidade. A análise de regressão linear múltipla foi realizada para verificar a possível relação entre a massa fresca e os demais parâmetros (comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento da raiz maior e número de raízes). Os tratamentos foram agrupados em função das distâncias euclidianas



**Figura 1** – a. sementes de *Vriesea incurvata*; b. plântulas de *V. incurvata* germinadas aos 60 dias; c. plântulas após 180 dias de cultivo *in vitro*; d. aclimatização das plântulas em substratos por 150 dias; e. plântulas cultivadas após a aclimatização; f. *V. incurvata* em ambiente natural no município de Carará, Rio Grande do Sul.

**Figure 1** – a. *Vriesea incurvata* seeds; b. *V. incurvata* plantlets germinated after 60 days; c. plantlets after 180 days of *in vitro* culture; d. plantlet acclimatization on substrates for 150 days; e. plantlets grown after acclimatization; f. *V. incurvata* in its natural environment in the municipality of Carará, Rio Grande do Sul.

**Tabela 1** – Composição do meio MS (Murashige & Skoog 1962) com a formulação completa e as reduções dos macronutrientes ou sais nitrogenados para a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata*.**Table 1** – Composition of MS medium (Murashige & Skoog 1962) with complete formulation and the reduction of macronutrients or nitrogen salts for *in vitro* propagation of *Vriesea incurvata*.

Componentes	Tratamentos				
	100MS	50M	25M	50N	25N
Macronutrientes (mg L <sup>-1</sup> )					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	412,5	825	412,5
KNO <sub>3</sub>	1900	950	475	950	475
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	220	110	440	440
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	185	92,5	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	42,5	170	170
Micronutrientes (mg L <sup>-1</sup> )					
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O			22,300		
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O			8,600		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>			6,200		
KI			0,830		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O			0,250		
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O			0,025		
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O			0,025		
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O			37,3		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O			27,8		

utilizando análise de agrupamento hierárquico com padronização das variáveis. As análises de Kruskal-Wallis e de agrupamento foram realizadas com o uso do programa BioEstat versão 5.3, e a análise de regressão linear múltipla foi realizada com o uso do programa SPSS versão 20.

### Resultados e Discussão

A germinação das sementes de *V. incurvata* foi de 95% após 60 dias de cultivo *in vitro*, pelo menos duas vezes superior aos maiores percentuais registrados em habitats naturais da espécie, sob o dossel de floresta ombrófila densa aluvial e em diferentes substratos, em que porcentagens de germinação entre 8,7% e 40,5% foram relatadas (Muraro *et al.* 2014). De um modo geral, diversas espécies de *Vriesea* Lindl. apresentam baixas porcentagens de germinação no ambiente natural (Mekers 1977; Mercier & Kerbauy 1995), enquanto que a cultura *in vitro* proporciona a germinação de um maior número de sementes em menor espaço de tempo (Mercier & Kerbauy 1995). De forma

semelhante a *V. incurvata*, as bromélias *V. gigantea* Gaudich. (Droste *et al.* 2005), *Pitcairnia flammea* Lindl. (Pereira *et al.* 2011), *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm. e *A. distichantha* Lem. (Santa-Rosa *et al.* 2013) apresentaram, respectivamente, 94, 99, 99 e 62% de germinação em meio MS. A alta produção de sementes por fruto da espécie (Reitz 1983; Negrelle & Muraro 2006), associada à elevada taxa de germinação *in vitro* permite a obtenção de um grande número de indivíduos, sem a necessidade de multiplicação via indução de brotos laterais, geralmente associada ao uso de reguladores de crescimento (Grattapaglia & Machado 1998; Droste *et al.* 2005). A propagação a partir de sementes permite a manutenção da variabilidade genética dos indivíduos propagados, que se tornam interessantes para programas de conservação *in situ*, por meio da reintrodução em ambiente natural (Benson 1999; Pinto *et al.* 2010).

O cultivo de plântulas na presença de diferentes concentrações de macronutrientes não influenciou negativamente a sobrevivência das

**Tabela 2** – Valores (média  $\pm$  desvio padrão) do comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento da raiz maior, número de raízes e massa fresca de plântulas de *Vriesea incurvata* após 180 dias de micropropagação em meio MS com diferentes concentrações de macronutrientes.

**Table 2** – Values (mean  $\pm$  standard deviation) of length of the aerial part, number of leaves, longest root length, number of roots and fresh mass of *Vriesea incurvata* plantlets after 180 days of micropropagation on MS medium with different concentrations of macronutrients.

Tratamento	Comprimento da parte aérea (cm)	Número de folhas	Comprimento da raiz maior (cm)	Número de raízes	Massa fresca (mg)
25M	3,9 $\pm$ 0,7 a	12,7 $\pm$ 2,5 ab	4,3 $\pm$ 1,5 cd	3,8 $\pm$ 1,2 ab	88 $\pm$ 37 a
50M	3,3 $\pm$ 0,6 bc	12,8 $\pm$ 2,1 a	4,4 $\pm$ 1,3 bc	3,6 $\pm$ 0,9 ab	67 $\pm$ 28 b
25N	3,8 $\pm$ 0,8 a	13,8 $\pm$ 5,0 a	5,4 $\pm$ 1,5 a	4,1 $\pm$ 1,5 a	91 $\pm$ 41 a
50N	3,4 $\pm$ 0,8 b	12,5 $\pm$ 2,7 ab	4,9 $\pm$ 1,8 ab	3,5 $\pm$ 1,1 b	84 $\pm$ 107 b
100MS	3,0 $\pm$ 0,7 c	11,9 $\pm$ 2,1 b	3,6 $\pm$ 1,2 d	3,0 $\pm$ 1,2 c	55 $\pm$ 26 c
H	46,9822	9,8049	34,3111	22,2171	42,7541
P	< 0,001	0,0438	< 0,001	0,0002	< 0,001

Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

plântulas de *V. incurvata*, que foi de 100% em todos os tratamentos. Também não foram observadas clorose e necrose nas folhas das plântulas (Fig. 1c), mesmo nos meios com as menores concentrações de macronutrientes, indicando que as plântulas não apresentaram deficiência de nutrientes reguladores de processos metabólicos, como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre (Taiz & Zeiger 2004; Marengo & Lopes 2011; Marschner 2012). Porém, a influência dos diferentes tratamentos pode ser observada em todos os parâmetros morfológicos avaliados nas plântulas. Os valores médios registrados para comprimento da parte aérea e massa fresca foram significativamente maiores quando as plântulas foram cultivadas no meio 25N (CPA = 3,8 cm; MF = 91 mg, respectivamente), bem como no meio 25M (CPA = 3,9 cm; MF = 88 mg, respectivamente). Os tratamentos com os meios 50N e 50M proporcionaram plântulas com valores estatisticamente intermediários para comprimento da parte aérea e massa fresca, enquanto que o meio 100MS não se mostrou benéfico para o crescimento das plântulas, que apresentaram valores significativamente menores para comprimento da parte aérea (CPA = 3 cm) e massa fresca (MF 55 mg; Tab. 2). O número de folhas produzidas por plântula foi semelhante nos diferentes tratamentos e as médias variaram de 11,9 a 13,8. As plântulas dos tratamentos com redução de macronutrientes ou apenas de sais nitrogenados não apresentaram diferenças significativas entre si. Entretanto, quando comparadas aos indivíduos propagados no meio 100MS, aqueles cultivados nos

meios 25N e 50M apresentaram números de folhas significativamente maiores (Tab. 2).

Os resultados registrados para *Vriesea incurvata* corroboram com a constatação de que menores concentrações de macronutrientes beneficiam o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de diversas espécies (Torres *et al.* 1998), inclusive de bromeliáceas (Mercier & Kerbauy 1994; Tamaki *et al.* 2007; Kurita *et al.* 2014; Martins *et al.* 2015). Indivíduos de *A. bromeliifolia* (Rudge) Baker apresentaram maior crescimento da parte aérea e mais massa seca de raízes e da parte aérea em meio MS contendo de zero a 50% da concentração original de macronutrientes (Fráguas *et al.* 2002). Para *A. blanchetiana*, o aumento gradativo da concentração de sais nitrogenados no meio MS levou ao decréscimo linear dos parâmetros morfológicos avaliados, sendo o meio com a menor concentração de sais nitrogenados (12,5%) considerado adequado para o cultivo desta bromélia (Kanashiro *et al.* 2007). Em um estudo de micropropagação de *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms em meio MS, os tratamentos com 25 e 100% de sais nitrogenados proporcionaram o maior crescimento dos indivíduos (Kurita & Tamaki 2014). Para *Nidularium minutum* Mez, foi relatado maior desenvolvimento das plântulas no meio MS com metade da concentração original dos macronutrientes em comparação às plântulas propagadas nos meios MS completos e Knudson (Knudson 1946); (Kurita *et al.* 2014). Especificamente o nitrogênio influencia diretamente no desenvolvimento das plântulas

dependendo da sua concentração disponível no meio (Avila *et al.* 1998; Cazetta *et al.* 1999; Ali *et al.* 2000), uma vez que altas concentrações de amônia e nitrato podem ser prejudiciais para o crescimento dos indivíduos (Sakuta *et al.* 1987).

A adaptação fisiológica de bromélias epífitas pode ser um fator importante na menor exigência de nutrientes minerais. De modo geral, bromélias tanque epifíticas, como *Vriesea incurvata*, obtêm nutrientes por meio da interceptação de elementos de origem atmosférica (Jordan *et al.* 1980; Oliveira & Coelho Neto 2001) e da lixiviação de substâncias presentes no tronco e nas folhas do forófito hospedeiro (Benzing 1973), tendo como veículo transportador a água da chuva. Além disso, o material orgânico resultante da decomposição de pequenos animais e de vegetais também é depositado sobre os epífitos (Nadkarni 1981, 1984). Os nutrientes acumulados nos espaços entre as folhas das bromélias tanque podem ser absorvidos por meio dos tricomas presentes na base foliar. Desse modo, no ambiente natural, espécies epifíticas estão expostas constantemente ao estresse da carência nutricional e apresentam maior eficiência na absorção de nutrientes (Benzing 2000). *V. gigantea*, uma bromélia tanque epífita demonstrou maior tolerância à escassez de nitrogênio quando comparada à espécie terrícola *Ananas comosus* (L.) Merr. em um estudo sob condições controladas (Endres & Mercier 2001a).

Em relação à formação do sistema radicular nas plântulas de *V. incurvata*, as concentrações de macronutrientes menores do que a original no meio MS foram benéficas. O tratamento 25N proporcionou maior número de raízes por plântula (NR = 4,1), sem diferir significativamente dos meios 25M e 50M (NR = 3,8 e 3,6, respectivamente). O comprimento da raiz maior foi superior no meio 25N (CRM = 5,4 cm), porém sem diferir significativamente do meio 50N (CRM = 4,9 cm). De outra forma, o tratamento com os sais completos do meio MS proporcionou menor número de raízes por plântula (NR = 3) e menor comprimento da raiz maior por plântula (CRM = 3,6 cm; Tab. 2). O uso de meios com concentrações reduzidas de macronutrientes pode estimular a formação e o crescimento das raízes (Grattapaglia & Machado 1998), importante para o contato com o substrato (Zhang *et al.* 2010). Tamaki *et al.* (2007) observaram o acúmulo cerca de 2,5 vezes superior da auxina ácido indolacético nas raízes de *A. comosus* cultivada na ausência de nitrogênio, sugerindo que tal hormônio pode ter sido translocado das

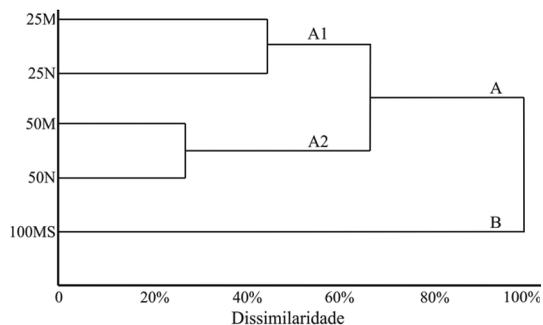
folhas para as raízes. As auxinas são responsáveis pelo alongamento celular e as raízes são sensíveis a elas (Davies 2010; Marschner 2012). Ressalta-se que o sistema radicular contribui com maior sobrevivência das plântulas durante a fase de aclimatização *ex vitro* (Besson *et al.* 2010).

As plântulas cultivadas nos meios 25N e 25M apresentaram as maiores massas frescas (MF = 91 e 88 mg, respectivamente), enquanto que os menores valores foram registrados para as plântulas mantidas em meio 100MS (MF = 55 mg; Tab. 2). A regressão linear múltipla indicou que o comprimento da parte aérea, o número de folhas e o número de raízes por plântula foram as variáveis mais importantes. O modelo mostrou que o comprimento da parte aérea foi responsável por 60% do coeficiente de determinação ( $r^2$  ajustado = 0,601;  $p < 0,001$ ), enquanto que o número de folhas adicionou 7% ( $r^2$  ajustado = 0,669;  $p < 0,001$ ) e o número de raízes adicionou 4% ( $r^2$  ajustado = 0,712;  $p < 0,001$ ) a este coeficiente. Desta forma, a massa fresca foi predita por uma combinação linear destas três variáveis, conforme a equação:  $MF = -6,361 + 1,336CPA + 0,698NF + 0,211NR$ , onde as siglas MF, CPA, NF e NR indicam massa fresca, comprimento da parte aérea, número de folhas por plântula e número de raízes por plântula, respectivamente.

Após aclimatização *ex vitro* por 150 dias, altas porcentagens de sobrevivência de indivíduos de *V. incurvata* foram registradas. Todos os indivíduos cultivados nos meios 25M e 25N sobreviveram e, para as plântulas providas dos tratamentos 50M e 50N, foram verificados 96,7% de sobrevivência, respectivamente. A menor porcentagem de sobrevivência foi registrada para as plântulas providas do meio com a concentração original de macronutrientes (93,3%). Resultados similares foram obtidos para indivíduos de *Nidularium minutum* cultivados em 50% dos macronutrientes originais do meio MS, que apresentaram 100% de sobrevivência após 90 dias de aclimatização (Kurita *et al.* 2014). Plântulas micropropagadas de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. & Schult.f.) Klotzsch aclimatizadas em substrato com irrigação de diferentes diluições do meio MS, apresentaram em média 95% de sobrevivência ao término de 240 dias (Santos *et al.* 2010). No entanto, espécies de bromeliáceas propagadas *in vitro* também podem apresentar porcentagens de sobrevivência inferiores, tais como *Dyckia maritima* Baker, que apresentou 63% a 91% de sobrevivência em diferentes substratos após 120 dias (Silva *et al.* 2008) e *A. blanchetiana*, para a qual 65% a 85%

dos indivíduos sobreviveram após 120 dias *ex vitro* (Tavares *et al.* 2008). A etapa de aclimatização de plântulas providas da cultura *in vitro* é considerada um processo intermediário importante para o estabelecimento das plantas no ambiente natural, uma vez que neste período podem ocorrer perdas elevadas de indivíduos (Pospíšilová *et al.* 1999). Durante a cultura *in vitro*, as plântulas crescem sob condições especiais, sendo expostas a elevada umidade relativa do ar, altos níveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos, carboidrato como fonte de carbono, havendo reduzidas trocas gasosas e baixa luminosidade disponível (Ziv 1994; Grattapaglia & Machado 1998; Pospíšilová *et al.* 1999), além de estômatos poucos funcionais, bem como cutícula delgada e parênquima paliçádico pouco desenvolvido (Díaz-Peres *et al.* 1995). A brusca mudança para as condições abióticas no ambiente *ex vitro* é fator limitante para a sobrevivência das plântulas (Lakso *et al.* 1986; Assis *et al.* 2009), pois impõe mudanças fisiológicas e morfológicas às plântulas (Debergh 1991).

A análise de agrupamentos com todos os parâmetros avaliados nas plântulas (comprimento da parte aérea, número de folhas por plântula, comprimento da raiz maior, número de raízes por plântula, massa fresca e sobrevivência na etapa de aclimatização) demonstrou a separação dos



**Figura 2** – Dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento hierárquico de tratamentos de meio de cultura com padronização variável, utilizando o índice de dissimilaridade com base na distância Euclidiana. N = porcentagens de sais nitrogenados do meio MS; M = porcentagens de macronutrientes do meio MS; MS = formulação completa do meio MS.

**Figure 2** – Dendrogram obtained from the hierarchical cluster analysis of culture medium treatments with variable standardization, using the dissimilarity index based on Euclidean distance. N = nitrogen salts percentages of MS medium; M = macronutrient percentages of MS medium; MS = complete formulation of MS medium.

tratamentos em A e B (Fig. 2). O grupo A se dividiu em dois sub-grupos, em que os meios 25M e 25N formaram o sub-grupo A1 pela influência similar destes tratamentos sobre os parâmetros avaliados nas plantas e os meios 50M e 50N se agruparam (A2) e se diferenciaram de A1. O meio 100MS ficou isolado dos demais tratamentos (B).

A redução de todos os sais macronutrientes ou apenas dos sais nitrogenados para 25% da concentração original no meio MS mostrou-se adequada para os parâmetros avaliados no presente estudo, promovendo o crescimento da parte aérea, a produção de folhas, a formação e o crescimento de raízes, bem como beneficiando a sobrevivência das plântulas na aclimatização *ex vitro*. Os resultados apontaram a importância de avaliar a composição mineral do meio de cultura, visando a determinar as condições ótimas para o processo de propagação de *V. incurvata* a partir de sementes para fins comerciais bem como para iniciativas de conservação da espécie.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), a concessão de bolsa de Mestrado (CAPES/FAPERGS) para o primeiro autor. E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), a bolsa de Iniciação Científica (PROBIC) para o segundo autor.

### Referências

- Ali, I.E.A.; Kafkafi, U.; Yamaguchi, I.; Sugimoto, Y. & Inanaga, S. 2000. Growth, transpiration, root-borne cytokinins and gibberellins, and nutrients compositional changes in sesame exposed to low root-zone temperature under different ratios of nitrate: ammonium supply. *Journal of Plant Nutrition* 23: 123-140.
- Assis, A.M.; Faria, R.T.; Unemoto, L.K.; Colombo, L.A. & Lone, A.B. 2009. Aclimatização de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) em substratos à base de coco. *Acta Scientiarum. Agronomy* 31: 43-47.
- Avila, A.D.; Pereira, S.M. & Arguello, J.A. 1998. Nitrogen concentration and proportion of  $\text{NH}_4\text{-N}$  affect potato cultivar response in solid and liquid media. *HortScience* 33: 336-338.
- Bencke, M. & Droste, A. 2008. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich. (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Pesquisas, Botânica* 59: 299-306.

- Benson, E.E. 1999. Plant conservation biotechnology. Taylor & Francis, London. 309p.
- Benzing, D.H. 1973. Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae. Quarterly Review of Biology 48: 277-290.
- Benzing, D.H. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge. 690p.
- Besson, J.C.F.; Oliveira, L.K.; Bonett, L.P. & Stefanello, S. 2010. Fontes e concentração de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. Revista Brasileira de Biociências 8: 9-13.
- BFG. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia 66: 1085-1113.
- Bourscheid, K. 2008. Levantamento das Bromeliaceae Juss. da fazenda Acaraú, Bertiooga, São Paulo. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal - Instituto de Botânica. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 82p.
- Cazetta, J.O.; Seebauer, J.R. & Below, F.E. 1999. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. Annals of Botany 84: 747-754.
- Davies, P. 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. Cornell University Department of Plant Biology, Ithaca. 802p.
- Debergh, P.C. 1991. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. Acta Horticulturae 289: 291-300.
- Díaz-Pérez, J.C.; Sutter E.G. & Shackel, K.A. 1995. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. Physiologia Plantarum 95: 225-232.
- Droste, A.; Silva, A.M.; Matos, A.V. & Almeida, J.W. 2005. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 717-722.
- Endres, L. & Mercier, H. 2001a. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. Journal of Plant Physiology 158: 205-212.
- Endres, L. & Mercier, H. 2001b. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. Journal of Plant Nutrition 24: 29-42.
- Endres Júnior, D.; Sasamori, M.H. & Droste, A. 2014. *In vitro* propagation of *Anathallis adenochila* (Loefgr.) F. Barros (Orchidaceae), a species endemic to southern and southeastern Brazil. Acta Botanica Brasílica 28: 489-494.
- Engelmann, F. 1997. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. Acta Horticulturae 447: 471-475.
- Fay, M.F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? Biodiversity and Conservation 3: 176-183.
- Fortes, G.R.L. & Pereira, J.E.S. 2001. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. Revista Brasileira de Fruticultura 23: 183-185.
- Forzza, R.C.; Costa, A.F.; Leme, E.M.C.; Versieux, L.M.; Wanderley, M.G.L.; Louzada, R.B.; Monteiro, R.F.; Judice, D.M.; Fernandez, E.P.; Borges, R.A.X.; Penedo, T.S.A.; Monteiro, N.P. & Moraes, M.A. 2013. Bromeliaceae. *In*: Martinelli, G. & Moraes, M.A. (ed.). Livro Vermelho da Flora do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Pp. 315-396.
- Fráguas, C.B.; Pasqual, M.; Dutra, L.F. & Chagas, E.A. 2002. Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de bromélia: sacarose e concentrações do meio MS. Revista Científica Rural 7: 55-63.
- Fundação SOS Mata Atlântica. 2015. Disponível em <<http://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>>. Acesso em 26 abril 2015.
- Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE. 2014. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2012-2013. Fundação SOS Mata Atlântica & São José dos Campos, INPE, São Paulo. 60p.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A. 1998. Micropropagação. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (eds.). 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. 2<sup>nd</sup> ed. Embrapa, Brasília. Pp. 183-260.
- Harper, J.L. 1977. Population biology of plants. Academic Press, New York. 892p.
- Instituto Brasileiro de Florestas. 2015. Disponível em <<http://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>>. Acesso em 26 abril 2015.
- Jordan, C.F.; Herrera, R. & Medina, E. 1980. Nutrient scavenging of rainfall by the canopy of an Amazonian rain forest. Biotropica 12: 61-66.
- Kanashiro, S.; Ribeiro, R.C.S.; Gonçalves, A.N.; Dias, C.T.S. & Jocys, T. 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. Hoehnea 34: 59-66.
- Kersten, R.A. 2010. Epífitas vasculares: histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. Hoehnea 37: 9-38.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin 14: 214-217.
- Kozay, T.; Kubota, C. & Jeong, B.R. 1997. Environmental control for large-scale production of plants through *in vitro* techniques. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 49-56.
- Kurita, F.M.K. & Tamaki, V. 2014. *In vitro* growth of the bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms with different concentrations of nitrogen. Acta Scientiarum. Biological Sciences 36: 279-285.
- Kurita, F.M.K.; Machado, B.M.; Teixeira, N.B.; Cesar, C.G.A.; Nievola, C.C. & Tamaki, V. 2014. Fenologia, cultivo *in vitro* e aclimatização da bromélia ameaçada de extinção *Nidularium minutum* Mez. Biotemas 27: 59-69.
- Lakso, A.N.; Reish, B.I.; Montensen, J. & Roberts, M.H. 1986. Carbon dioxide enrichment for stimulation of

- growth of *in vitro* propagated grapevines after transfer from culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 111: 634-638.
- Luther, H. 2010. An alphabetical list of bromeliads binomials. Bromeliad Society International, Sarasota. 114p.
- Marenco, R.A. & Lopes, N.F. 2011. Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 486p.
- Marschner, H. 2012. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. 672p.
- Martinelli, G.; Vieira, C.M.; Gonzalez, M.; Leitman, P.; Piratininga, A.; Costa, A.F. & Forzza, R.C. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59: 209-258.
- Martins, J.P.R.; Pasqual, M.; Martins, A.D. & Ribeira, S.F. 2015. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). *Australian Journal of Crop Science* 9: 85-91.
- Mekers, O. 1977. *In vitro* propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Acta Horticulturæ* 78: 311-320.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B. 1994. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of the Bromeliad Society* 44: 120-124.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B. 1995. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana* 16: 147-149.
- Muraro, D.; Negrelle, R.R.B. & Anacleto, A. 2014. Germinação e sobrevivência de *Vriesea incurvata* Gaudich. sob dossel florestal em diferentes substratos. *Scientia Agraria Paranaensis* 13: 251-258.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nadkarni, N.M. 1981. Canopy roots: convergent evolution in rainforest nutrient cycles. *Science, New Series* 214: 1023-1024.
- Nadkarni, N.M. 1984. Epiphyte biomass and nutrient capital of a neotropical Elfin Forest. *Biotrópica* 16: 249-256.
- Negrelle, R.R.B. & Muraro, D. 2006. Aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich (Bromeliaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 28: 95-102.
- Oliveira, R.R. & Coelho Netto, A.L. 2001. Captura de nutrientes atmosféricos pela vegetação na Ilha Grande, RJ. *Revista Pesquisa, Botânica* 51: 31-49.
- Padilha, V. 1978. Bromeliads. Crow Publisher Inc., New York. 134p.
- Pedroso-de-Moraes, C.; Diogo, J.A.; Pedro, N.P.; Canabrava, R.I.; Martini, G.A. & Marteline, M.A. 2009. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae) utilizando os fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biociências* 7: 67-69.
- Pereira, E.O.; Lima, A.B.P.; Nogueira, E.U.; Couto, D.R. & Soares, T.C.B. 2011. Germinação *in vitro* de *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae): efeito do meio de cultivo e carvão ativado. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer* 7: 634-642.
- Pinto, J.R.S.; Freitas, R.M.O. & Praxedes, S.C. 2010. Stimulation of *in vitro* development of *Cattleya granulosa* by sucrose. *General and applied Plant Physiology* 36: 183-188.
- Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadlec, P.; Haisel, D. & Plzánková, S. 1999. Acclimatization of micropropagated to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497.
- Reitz, R. 1983. Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica. *In: Reitz, R. (ed.). Flora ilustrada catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí.* 518p. Rio Grande do Sul. Decreto nº 52.109, de 1 de dezembro de 2014. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul. Ano LXXII. Vol. 233. *Lex-Diário Oficial do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.* Pp. 2-11.
- Sakuta, M.; Takagi, T. & Komamine, A. 1987. Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum* 71: 459-463.
- Santa-Rosa, S.; Souza, F.V.D.; Vidal, A.M.; Ledo, C.A.S. & Santana, J.R.F. 2013. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. *Horticultura Brasileira* 31: 112-118.
- Santos, D.S.; Tamali, V. & Nievola, C.C. 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 46: 524-529.
- Sasamori, M.H.; Endres Júnior, D. & Droste, A. 2014. Sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) micropropagadas e aclimatadas em substrato com fibra de coco. *Revista Pesquisas, Botânica* 65: 293-303.
- Silva, A.L.L.; Franco, E.T.H.; Dornelles, E.B. & Gesing, J.P.A. 2008. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. *Iheringia, Série Botânica* 63: 135-138.
- Sorace, M.; Faria, R.T. de; Damasceno Júnior, C.V.; Gomes, G.P.; Barbosa, C.M.; Vieira, F.G.N.; Silva, G.L. da; Takahashi, L.S.A. & Schnitzer, J.A. 2008. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. *Ciências Agrárias* 29: 775-782.
- Stancato, G.C. & Faria, R.T. 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of lithophytic orchid *Laelia*

- cinnabarina* Batem (Orchidaceae) I: Effects of macro and microelements. *Lindleyana* 11: 41-43.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. Artmed, Porto Alegre. 719p.
- Tamaki, V.; Mercier, H. & Nievola, C.C. 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34: 69-73.
- Tavares, A.R.; Giampaoli, P.; Kanashiro, S.; Aguiar, F.F.A. & Chu, E.P. 2008. Efeito da adubação foliar com KNO<sub>3</sub> na aclimatização de bromélia cultivada *in vitro*. *Horticultura Brasileira* 26: 175-179.
- Thorpe, T.A. & Harry, I.S. 1997. Application of tissue culture to horticulture. *Acta Horticulturae* 447: 39-49.
- Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa, Brasília. 512p.
- Unemoto, L.K.; Faria, R.T. de; Vieira, A.O.S. & Dalio, R.J.D. 2007. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. *Revista Brasileira Agrociência* 13: 267-269.
- Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Melhen, T.S. & Giulietti, A.M. 2006. *Flora Fanerogâmica do estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo. Vol. 5, pp. 392.
- Winkler, M.; Hülber, K. & Hietz, P. 2005. Effect of canopy position on germination and seedling survival of epiphytic bromeliads in a Mexican humid Montane Forest. *Annals of Botany* 95: 1039-1047.
- Zhang, Z.; Song, H.; Liu, Q.; Rong, X.; Guan, C.; Peng, J.; Xie, G. & Zhang, Y. 2010. Studies on differences of nitrogen efficiency and root characteristics of oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars in relation to nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition* 33: 1148-1459.
- Ziv, M. 1994. *In vitro* Acclimatization. In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T. & Smith, M.A.L. (ed.). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 493p.