



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



SANDRA SANTA ROSA

**PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
BROMÉLIAS DO GÊNERO *AECHMEA* DE VALOR
ORNAMENTAL**

Feira de Santana, BA
2010

SANDRA SANTA ROSA

**PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
BROMÉLIAS DO GÊNERO *AECHMEA* DE VALOR
ORNAMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana (UEFS)
Co-orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza
(EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura Tropical)

Feira de Santana, BA
2010

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Santa Rosa, Sandra

S222p Propagação e conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental./ Sandra Santa Rosa. – Feira de Santana, 2010.

86 f : il. : tab.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana

Co-orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

1.Bromélias – Cultura de tecidos. 2.Bromélias – Conservação de germoplasma. 3.Plantas ornamentais. I.Santana, José Raniere Ferreira de. II.Souza, Fernanda Vidigal Duarte. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.564

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Profa. Dra. Daniela Garcia Silveira
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana - BA
2010

À minha mãe Marinalva, meu pai José Santa Rosa e meus irmãos, Washington e Wilson, que são minha fonte de força. Obrigada por todo apoio, compreensão e princípios, fundamentais para realização e conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela minha existência, força, determinação e por estar sempre presente em minha vida.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, caráter, convivência e confiança depositada em mim.

À Pedro, pelo carinho, companheirismo e compreensão.

Ao Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana, pela orientação, confiança, ensinamentos e atenção durante o trabalho.

À Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza pela orientação, amizade, ensinamentos, dedicação, paciência e disponibilidade em me guiar durante toda a realização deste trabalho. Aprendi muito com você, como pesquisadora e pessoa, um exemplo de profissionalismo e seriedade em tudo o que faz. Que Deus ilumine sempre seu caminho.

Aos pesquisadores, Carlos Ledo, Antonio Souza, Janay Almeida e Tatiana Junghans, pelos ensinamentos e sugestões.

Às amigas Ádila e Daniela, pela amizade, companheirismo, apoio, conversas e risadas, e por terem me aconselhado nos momentos mais difíceis. Obrigada pela grande ajuda.

Ao amigo Hilo, por todas as contribuições e ensinamentos, principalmente nas fases finais do meu trabalho.

Aos estagiários e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Ádila, Daniela, Davi, Fiúza, Frederico, Helder, Hilo, Honorato, Juraci, Kelly, Mariane, Marianinha, Meire, Moema, Taliane, Tânia e ao funcionário Benedito Conceição. Obrigada a todos pela amizade, pela ajuda e convívio prazeroso.

Às queridas amigas, Carla, Rosinha e Sheu, pela amizade sincera e pelo apoio.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela contribuição profissional. À Helton e Alberto, secretários do curso de Biotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais, pela atenção e eficiência na prestação dos serviços.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelo estágio de graduação e pela oportunidade de realização desse trabalho, disponibilizando estrutura física, financeira e humana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa dissertação e para minha formação profissional.

Muito obrigada!

“A maior recompensa pelo esforço de uma pessoa não é o que ela ganha com isso, mas o que ela se torna através dele.” (John Ruskinz).

RESUMO

A crescente utilização de Bromeliaceae como plantas ornamentais e o crescente interesse da horticultura por espécies nativas têm favorecido o extrativismo ilegal de espécies dessa família. *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, *Aechmea distichantha* Lemaire e *Aechmea leptantha* (Harms) Leme & J.A. Siqueira, são bromélias nativas e com potencial ornamental. A falta de um sistema de cultivo estabelecido tem aumentado o extrativismo predatório nos últimos anos e levado essas espécies à uma condição de ameaça. O objetivo desse trabalho foi desenvolver protocolos de germinação de sementes *in vitro* e micropropagação de *A. blanchetiana* e *A. distichantha* e conservação *in vitro* dessas espécies e da espécie *A. leptantha*. Foi avaliada a germinação *in vitro* quanto à presença e ausência de luz e o efeito de diferentes reguladores vegetais na fase de multiplicação. As plantas foram multiplicadas em meio MS suplementado com as combinações de 0,05 e 0,5 μM de ANA e 2,2 e 4,4 μM de BAP e CIN. Na conservação *in vitro* foram testadas 3 concentrações de sais do meio MS (MS, $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{3}$ MS) e 2 ambientes de cultivo, sala de crescimento (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16h) e sala de conservação (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h), para as 3 espécies de *Aechmea* (*A. leptantha*, *A. blanchetiana* e *A. distichantha*). Sementes de *A. blanchetiana* e *A. distichantha* mostraram ser fotoblásticas positivas, com porcentagens de germinação de 98,85% e 62,09% na presença de luz. Todos os tratamentos formaram brotos adventícios, sendo que o meio MS suplementado com 0,5 μM ANA + 2,2 μM BAP promoveu as melhores taxas de multiplicação nas duas espécies. A citocinina BAP promoveu a formação de brotos sem raízes, enquanto a CIN favoreceu a formação de raízes em detrimento do número de brotações. Os resultados mostraram ser possíveis conservar plantas das três espécies sob crescimento lento, por doze meses, em meio de cultura com $\frac{1}{3}$ MS, nas condições da sala de conservação (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h).

Palavras-chave: Bromélias ornamentais. Cultura de tecidos. Conservação de germoplasma.

ABSTRACT

The increasing use of bromeliads as ornamental plants and the growing interest in gardening with native species have favored the illegal extraction of species in this family. *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, *Aechmea distichantha* Lemaire and *Aechmea leptantha* (Harms) Leme & JA Siqueira are native bromeliads with ornamental potential. Without a crop production system the predatory extraction have been growing in the last years and has leading this species to threatened conditions. The aim of this study was to develop an efficient system to plant production using micropropagation techniques to *A. blanchetiana* and *A. distichantha* and an *in vitro* conservation system of these species and *A. leptantha*. *In vitro* germination was performed and evaluated under presence or absence of light. On the multiplication phase the effect of different plant growth regulators were evaluated. Plants were cultivated on MS medium supplemented with 0.05 and 0.5 μM NAA in combination with 2.2 and 4.4 μM of BAP or KIN. To establish the *in vitro* conservation protocol three concentrations of MS salts were tested (MS, 1/2 MS and 1/3 MS) and two incubation condition were evaluated: the growth chamber and the conservation chamber with different temperatures, light intensity and photoperiod for 3 species of *Aechmea* (*A. leptantha*, *A. and A. blanchetiana distichantha*). Seeds of *A. blanchetiana* and *A. distichantha* presented photoblastic behavior with 98.85% and 62.09% of germination respectively under light condition. All treatments formed adventitious buds, and the MS medium supplemented with 0.5 μM NAA + 2.2 μM BAP promoted the best multiplication rates in both species. The BAP promoted the formation of shoots without roots, while KIN favored higher rooting at the expense of the shoot number. The results showed that it is possible to keep under slow growth for twelve months, plants of *A. leptantha*, *A. blanchetiana* and *A. distichantha* in media culture with 1/3 MS in conservation chamber (temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photon flux density and 12h photoperiod).

Keywords. Ornamental bromeliads. Tissue culture. Germplasm conservation.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** Plantas em florescimento das espécies: *A. blanchetiana* (A), *A. distichantha* (B) e *A. leptantha* (C). 19

CAPÍTULO 1

- Figura 1** Germinação cumulativa *in vitro* de sementes de *A. blanchetiana* em duas condições de cultivo. 40
- Figura 2** Germinação cumulativa *in vitro* de sementes de *A. distichantha* em duas condições de cultivo. 41
- Figura 3** Germinação *in vitro* de sementes de *A. blanchetiana* aos 25 dias de cultivo em ausência (A) e presença de luz (B) e de *A. distichantha* aos 45 dias de cultivo em ausência (C) e presença de luz (D). 43
- Figura 4** Brotos de *A. blanchetiana* (A e B) e *A. distichantha* (C e D) após o terceiro subcultivo, em meio contendo BAP (A e C) e CIN (B e D). 48

CAPÍTULO 2

- Figura 1** Comprimento da parte aérea de plantas de *A. blanchetiana*, mantidas em sala de conservação e sala de crescimento, ao longo de 12 meses de conservação *in vitro*. 71
- Figura 2** Comprimento da parte aérea de plantas de *A. distichantha*, mantidas em sala de conservação e sala de crescimento, ao longo de 12 meses de conservação *in vitro*. 71
- Figura 3** Comprimento da parte aérea de plantas de *A. leptantha*, mantidas em sala de conservação e sala de crescimento, 72

ao longo de 12 meses de conservação *in vitro*.

Figura 4 Plantas de três espécies de *Aechmea*, após 12 meses de cultivo em sala de conservação e crescimento. 73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Porcentagem total de germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>A. blanchetiana</i> avaliada aos 25 dias e <i>A. distichantha</i> , avaliada aos 45 dias de inoculação em duas condições de cultivo.	40
Tabela 2	Resumo da análise de variância para o número médio de brotos de <i>A. blanchetiana</i> após o terceiro subcultivo.	44
Tabela 3	Número médio de brotos de <i>A. blanchetiana</i> após o terceiro subcultivo.	44
Tabela 4	Resumo da análise de variância para número médio de brotos de <i>A. distichantha</i> , após o terceiro subcultivo.	45
Tabela 5	Número médio de brotos de <i>A. distichantha</i> em função da concentração de ANA, após o terceiro subcultivo.	45
Tabela 6	Número médio de brotos de <i>A. distichantha</i> em função do tipo e concentração de citocinina, após o terceiro subcultivo.	46
Tabela 7	Comparação do número médio de brotos de <i>A. blanchetiana</i> e <i>A. distichantha</i> , entre tratamentos vs. testemunha.	46

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de brotos (NB), em função da espécie (ES), do meio de cultura (ME), da condição de cultivo (CO) e do efeito do tempo de conservação (TE), sob esses fatores, na conservação <i>in vitro</i> de <i>A. blanchetiana</i> , <i>A. distichantha</i> e <i>A. leptantha</i> .	64
Tabela 2	Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas	66

verdes (NFV) e número de folhas senescentes de espécies de *Aechmea*, na conservação *in vitro*.

Tabela 3	Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas verdes (NFV) em função das espécies de <i>Aechmea</i> e do meio de cultura, na conservação <i>in vitro</i> .	67
Tabela 4	Número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) em função da espécie de <i>Aechmea</i> e da condição de cultivo, na conservação <i>in vitro</i> .	68
Tabela 5	Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas senescentes (NFS) em função do meio de cultura e da condição de cultivo, na conservação <i>in vitro</i> .	69
Tabela 6	Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas senescentes (NFS) em função da condição de cultivo e do tempo de conservação <i>in vitro</i> .	70
Tabela 7	Taxa de crescimento geométrico (%) do comprimento da parte aérea (CPA) de três espécies de <i>Aechmea</i> , conservadas <i>in vitro</i> em diferentes tratamentos.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA- Ácido naftalenoacético

BAP- 6 - Benzilaminopurina

CIN- Cinetina

CV- Coeficiente de variação

F- Valor da análise de variância

FV- Fonte de variação

GL- Grau de liberdade

QM- Quadrado médio

ns- não significativo à 5% de probabilidade pelo teste F

MS- Meio nutritivo de Murashige & Skoog, 1962

1/2 MS- Meio nutritivo de Murashige & Skoog com metade da concentração dos sais

1/3 MS- Meio nutritivo de Murashige & Skoog, 1962 com 1/3 da concentração dos sais

μM- Micromolaridade

μmol.m⁻²s⁻¹- Micromol por metro quadrado por segundo

CA- Concentração de ANA

CT- Citocinina

CC- Concentração de citocinina

ES- Espécie

ME- Meio de cultura

CO- Condição de cultivo

TE- Tempo de conservação *in vitro*

CPA- Comprimento da parte aérea

NFV- Número de folhas verdes

NFS- Número de folhas senescentes

NB- Número de brotos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
CAPÍTULO 1	31
Micropropagação de <i>Aechmea blanchetiana</i> (Baker) L. B. Smith e <i>Aechmea distichantha</i> Lemaire	
1.1 INTRODUÇÃO	34
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	36
1.2.1 Germinação <i>in vitro</i> de <i>A. blanchetiana</i> e <i>A. distichantha</i>	36
1.2.2 Multiplicação <i>in vitro</i> de brotos adventícios de <i>A. blanchetiana</i> e <i>A. distichantha</i>	37
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
1.3.1 Germinação <i>in vitro</i> de <i>A. blanchetiana</i> e <i>A. distichantha</i>	38
1.3.2 Multiplicação <i>in vitro</i> de brotos adventícios de <i>A. blanchetiana</i> e <i>A. distichantha</i>	43
1.4 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
CAPÍTULO 2	55
Conservação <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Aechmea</i>	
2.1 INTRODUÇÃO	58
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.2.1 Germinação <i>in vitro</i>	61
2.2.2 Desenvolvimento <i>in vitro</i>	62
2.2.3 Conservação <i>in vitro</i>	62
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
2.4 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
CONCLUSÃO GERAL	83

INTRODUÇÃO GERAL

Bromeliaceae é uma família essencialmente neotropical que possui mais de 3000 espécies distribuídas em 56 gêneros (LUTHER, 2006), com exceção de uma única espécie, *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Moldboard, que ocorre no oeste do continente africano (SMITH & DOWNS, 1974). Estima-se que o Brasil abrigue um percentual superior a 50% das espécies, sendo 40% delas nativas e 80% dos gêneros, onde 22% deles são endêmicos do território brasileiro, colocando assim o nosso país, entre os mais importantes em termos de variabilidade genética desta família. Ocorrem em todo território brasileiro e são comuns a vários biomas e habitats, como a Caatinga, a Floresta Amazônica, o Cerrado e a Mata Atlântica (FORZZA, 2005; TERAO *et al.*, 2005; LUTHER, 2006).

Segundo Cronquist (1988) a família subdivide-se em três subfamílias, Pticarnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae. A diferença entre as três subfamílias é baseada em características morfológicas, tais como tipo de frutos e sementes, margem das folhas e posição do ovário (SMITH & DOWNS, 1974).

A subfamília Pticairnoideae é normalmente referida como a mais primitiva entre as três subfamílias. Caracteriza-se por apresentar ovário súpero, fruto em cápsula com sementes geralmente providas de alas ou outros apêndices. Essa subfamília inclui plantas terrestres, geralmente folhas com espinhos nas margens (SMITH & DOWNS, 1974; FORZZA, 1998; MOREIRA *et al.*, 2006; SANTOS, 2009). Tillandsioideae possui plantas essencialmente epífitas, cujas raízes têm como função principal a fixação da planta no substrato, sendo consideradas espécies mais especializadas, apresentando folhas com margem inteira, ovário súpero ou raramente semi-ífero (*Glomeroptcairnia*) e sementes com tufo de apêndices plumosos nas extremidades (MOREIRA *et al.*, 2006; SANTOS, 2009). Já os membros da subfamília Bromelioideae apresentam características bem variadas, podendo ser terrestres ou epífitas. Caracterizam-se pelo fruto em baga, ovário ífero, sementes sem apêndices e folhas com espinhos nos bordos, sendo a raiz responsável pela absorção de nutrientes e/ ou fixação (PAULA, 2000; MOREIRA *et al.*, 2006).

Com pelo menos 60% de suas espécies encontradas no território brasileiro, o gênero *Aechmea* é o maior dessa subfamília e reúne cerca de 243 espécies (LUTHER, 2006) organizadas em oito subgêneros: *Aechmea* Ruiz & Pav.,

Chevaliera (Gaudich. Ex Beer) Baker, *Lamprococcus* (Beer) Baker, *Macrochordion* (de Vriese) Baker, *Ortgiesia* (Regel) Mez, *Platyaechmea* (Baker) Baker, *Podaechmea* Mez e *Pothuava* (Baker) Baker. Destes, apenas *Podaechmea* não possui representantes no Brasil. A combinação de uma grande diversidade estrutural e morfológica com a precaridade do conhecimento acerca da delimitação consistente de suas espécies – e, conseqüentemente, dos próprios gêneros e subgêneros – faz de *Aechmea* um dos mais importantes desafios da pesquisa taxonômica da atualidade. (SIQUEIRA FILHO & LEME, 2006).

Dentre as bromeliáceas, o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill), destaca-se como o representante de maior valor econômico, por ser comestível e amplamente cultivado em todo o mundo. Além deste, outras espécies são utilizadas na medicina tradicional, na indústria de alimentos ou na extração de fibras, além da significância da espécie, enquanto recurso biológico, sendo suas plantas utilizadas por diversas espécies de répteis e insetos, como fonte de água, alimento, abrigo ou sítio de acasalamento (NADKARNI, 1991). No entanto, o interesse na grande maioria das bromélias, nos últimos anos, vem sendo pautado em seu potencial ornamental, principalmente pelo exotismo de suas flores, inflorescências vistosas, brácteas coloridas e folhas distribuídas em roseta. Os representantes dessa família têm sido comercializados principalmente para decorações de interiores e projetos paisagísticos (COFFANI-NUNES, 2002; FRAZÃO, 2006).

No Brasil, o setor de Floricultura movimenta no mercado interno um valor global em torno de US\$ 1,3 bilhões/ano (ANUÁRIO, 2007) e cresce anualmente 20%, sendo o quinto setor da agricultura nacional (BATALHA & BUAINAIM, 2007). O Nordeste tem apresentado acentuado desenvolvimento nesse setor, a partir da última década do século XX e na Bahia a Floricultura vem se destacando a partir de 2001, como importante alternativa de trabalho e renda para as mais diversas classes da população, tornando-se o mais novo setor econômico e produtivo na agricultura baiana. Estimativa realizada em 2006 revelou uma produção de cerca de 300 mil dúzias de flores por ano na Bahia, movimentando, no mercado atacadista, mais de R\$ 3 milhões/ano, além de plantas ornamentais e folhagens produzidas em aproximadamente 50 municípios baianos (SCHERER, 2006). Portanto, o volume comercializado na Bahia ultrapassa a casa dos R\$ 15 milhões/ano no atacado, que equivale dizer que deste montante, a participação dos produtores baianos no mercado brasileiro gira em torno de 20% (BRAINER & OLIVEIRA, 2007).

Dentre as espécies comercializadas, as bromélias destacam-se como uma das principais espécies de flores e plantas ornamentais, cultivadas em vasos. Essas plantas apresentam um grande potencial florístico, se adaptam muito bem aos vasos e também, são muito utilizadas em projetos paisagísticos. As bromélias dos gêneros *Aechmea*, *Guzmania*, *Neoregelia*, *Tillandsia* e *Vriesea* são as mais comercializadas (JUNQUEIRA & PEETZ, 2008).

Entretanto, apesar de crescente, o cultivo comercial de bromélias na Região Nordeste, principalmente no Estado da Bahia, ainda é incipiente e as espécies comercializadas são obtidas principalmente através do extrativismo predatório, devido à disponibilidade dessas bromélias em seu ambiente natural e o acesso amplamente facilitado a estas. Esta ação associada à redução e fragmentação dos ambientes naturais, sem a reposição natural dos estoques de bromélias, vem provocando grandes danos ambientais, dentre estes a redução da diversidade específica, levando muitas espécies a uma erosão genética significativa ou à própria extinção.

Uma amostra desse dano encontra-se na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção, publicada em 2008 pelo Ministério do Meio Ambiente, que cita um total de 38 espécies de Bromeliaceae, um acréscimo de 23 espécies em relação à lista publicada em 1992 (IBAMA, 2010).

Apesar da publicação desses dados, sabemos que na realidade o número de espécies de bromélias ameaçadas pode ser bem maior, carecendo de estudos e estratégias que visem amenizar sua extinção, principalmente das espécies nativas ou endêmicas. Assim, há necessidade de informações técnicas que possam promover o aumento da produtividade, qualidade e introdução de novos clones no mercado, bem como desenvolver estratégias de conservação dessas espécies, principalmente as ameaçadas.

Nesse sentido, para a realização desse trabalho, selecionaram-se três espécies de *Aechmea* com potencial ornamental, principalmente, para paisagismo. A *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith (Figura 1A) é uma bromélia terrestre nativa do Brasil e endêmica dos Estados da Bahia e Espírito Santo, herbácea, perene, rizomatosa, robusta, com folhagem e inflorescências decorativas de 60 a 90 cm de altura, e vegetam nas Restingas e Mata Atlântica (LORENZI & SOUZA, 1998; KANASHIRO *et al.*, 2007; MARTINELLI *et al.*, 2008). *Aechmea distichantha* Lemaire (Figura 1B), é uma espécie típica do Cerrado brasileiro, nativa do sul do Brasil, norte

da Argentina, Paraguai e Uruguai, de diferentes hábitos (epífita, saxícola ou terrestre), com roseta ereta de folhas arqueadas de até 90 cm de altura e que floresce apenas uma vez por ano, ainda que a inflorescência tenha uma durabilidade de até um mês (GILMAN, 2009; FLORIDATA, 2009). Finalmente, a *Aechmea leptantha* (Harms) Leme & J.A. Siqueira (Figura 1C) é uma bromélia nativa do Brasil que ocorre em várias formações vegetacionais na Zona da Mata, passando pelo Agreste, em áreas de Caatinga hipoxerófila, até os úmidos Brejos de Altitude nos Estados da Paraíba, Pernambuco e Alagoas. De hábito terrestre, rupícola ou epífita, apresenta inflorescência laranja largamente e esparsamente paniculada, que duram um longo período (SIQUEIRA FILHO & LEME, 2006; MARTINELLI *et al.*, 2008) e são, a semelhança das outras, extremamente ornamentais. Apesar de nenhuma das três espécies em estudo estarem na lista de espécies ameaçadas de extinção, não existe plantio comercial das mesmas e o que vem sendo comercializado é obtido principalmente através do extrativismo predatório, colocando essas espécies em constante ameaça.

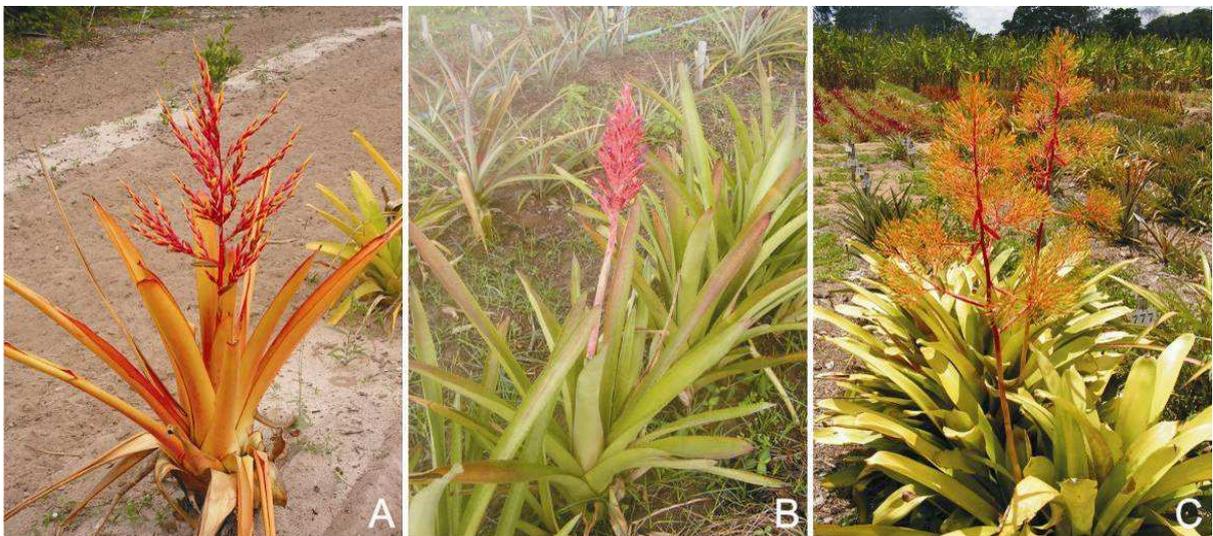


Figura 1: Plantas em florescimento das espécies: *A. blanchetiana* (A), *A. distichantha* (B) e *A. leptantha* (C).

Considerando o exposto, a propagação em larga escala dessas espécies de bromélias de interesse ornamental, que vêm sendo comercializadas a partir de extrativismo, aliada a conservação *in vitro*, pode ser uma alternativa para reduzir o

impacto da retirada dessas plantas do seu ambiente natural, por meio da ampla oferta de mudas produzidas para o mercado interno e externo, além da introdução de materiais rústicos e de beleza singular.

Para isso, primeiramente é preciso entender o processo de propagação dessas espécies. As bromélias de forma geral podem propagar-se de forma sexuada, por meio de sementes, ou assexuada, por um processo vegetativo.

No processo de reprodução assexuada, formam-se brotos a partir da planta mãe, que podem sair da base da planta por estolhos ou rizomas, ou do interior da própria roseta. No entanto, essas brotações surgem geralmente durante ou após a floração, e ao atingirem aproximadamente um terço do tamanho da planta mãe, poderão ser usadas como mudas (PAULA & SILVA, 2001). A desvantagem desse processo é o número limitado de brotações, originando poucos filhos/planta/ano e da disseminação de doenças, além de agravar ainda mais a situação de muitas espécies ameaçadas, uma vez que a planta matriz pode ser danificada ou retirada no processo (SOUZA *et al.* 2009; RECH FILHO, 2004). Já o processo sexual envolve a formação de sementes, das quais podem ser obtidas grandes quantidades de plantas, considerado de grande importância na conservação de germoplasma de bromélias ameaçadas de extinção, já que assegura a variabilidade natural e a diversidade genética dessas espécies. No entanto, essa forma de propagação é demorada, pois, a depender da espécie, a maturação das sementes pode levar até um ano após a polinização (RAUH, 1979; RECH FILHO, 2004).

Considerando as dificuldades dos métodos naturais de propagação e da incapacidade de atender a demanda de mudas do mercado de floricultura, nas últimas décadas, a biotecnologia por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro* se constituiu em uma ferramenta valiosa na propagação e conservação de muitas espécies (WITHERS & WILLIAMS, 1998). Dentre essas técnicas, a micropropagação é a de maior impacto na agricultura, já que propiciam a produção de um elevado número de plantas uniformes em um curto espaço de tempo, de alta qualidade e livres de doença, características essenciais para a aplicação comercial. Adicionalmente é uma técnica que presta auxílio significativo para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, principalmente quando é feita a partir de plantas obtidas de sementes germinadas *in vitro*, garantindo a variabilidade genética da espécie (SANTOS *et al.*, 2007). Além disso, explantes provenientes de plantas obtidas a partir da germinação de sementes ou de plantas propagadas *in vitro* não

requerem a etapa de desinfestação e apresentam boa eficiência de regeneração (CARNEIRO & MANSUR, 2004).

Essa técnica tem sido uma alternativa viável na produção comercial de Bromeliaceae, além de subsidiarem o desenvolvimento de protocolos para a conservação *in vitro* das mesmas (SOUZA *et al.*, 2009).

Já foram descritos diversos protocolos de micropropagação para espécies de Bromeliaceae, tendo sido os primeiros, desenvolvidos por Mapes (1973) e Jones & Murashige (1974). Em seguida, foram descritos diversos outros, tanto para espécies de interesse ornamental, como para espécies nativas, endêmicas ou ameaçadas, como *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) (ARRABAL *et al.*, 2002), *Acanthosachys strobilacea* (Schultes f.) Klotzsch, *Aechmea bambusoides* L. B. Smith & Reitz e *Quesnelia quesneliana* (Brongniart) L. B. Smith (FIGUEIREDO, 2003), *Vriesea reitzii* Leme & Costa (RECH FILHO *et al.*, 2005), *Billbergia distachia* (Vellozo) Mez (MENDES *et al.*, 2007), *Dyckia marítima* Baker (SILVA *et al.*, 2008) e *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Entretanto, existem diferenças nos protocolos de multiplicação estabelecidos que vão depender de diferentes fatores, como o estado fisiológico do material vegetal, condições de cultivo da cultura, genótipo e principalmente, do meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Embora não exista uma formulação padrão, o meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com suas modificações e diluições, tem apresentado bons resultados na micropropagação de diversas espécies de bromélias, como *Aechmea bromelifolia* (Rudge) Baker (FRÁGUAS *et al.*, 2002), *Vriesea gigantea* Gaudichaud e *Vriesea philippocoburgii* Wawra (DROSTE *et al.*, 2005), *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith (GALVANESI, *et al.*, 2007), *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (MENDES *et al.*, 2007) e *Ananas comosus* (L.) Merril (SOUZA *et al.*, 2009), sendo que as variações mais freqüentes dizem respeito à composição de macronutrientes e reguladores vegetais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; MELO *et al.*, 1999).

Além da necessidade de se estabelecer protocolos para propagação em larga escala dessas espécies, a conservação *ex situ* desses germoplasmas deve ser considerada como estratégica, em vista do papel estruturante das Bromeliaceae e da ameaça crescente dos biomas onde se encontram inseridas, tais como a Mata Atlântica, Restinga, Caatinga e Cerrado (SIQUEIRA FILHO & LEME, 2006).

Aliada às diversas estratégias de conservação, como Banco Ativo de Germoplasma (BAG) *ex situ* em condições de campo e a conservação de sementes, a conservação *in vitro* de plantas micropropagadas é uma das alternativas de conservação de germoplasma que vem sendo largamente utilizada em muitas espécies de importância econômica, notadamente aquelas propagadas assexuadamente, (GIACOMETTI & GOES, 1993; CANTO *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2009).

Esse tipo de conservação consiste na manutenção de plantas micropropagadas em condições de crescimento mínimo por meio da intervenção de diferentes fatores do cultivo como, redução da temperatura de incubação, radiação fotossintética ativa, fotoperíodo, e da adição de retardantes osmóticos e hormonais ao meio de cultura (CANTO *et al.*, 2004).

As vantagens de um BAG *in vitro* são inúmeras, podendo-se ressaltar, principalmente, a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que existem no campo (VALOIS *et al.*, 2001), além de ser considerada como uma duplicata de segurança, uma das premissas básicas para a conservação de germoplasma vegetal.

Withers & Williams (1998) informam que a utilização da conservação *in vitro* é indicada tanto por razões econômicas como práticas, sendo um componente importante também na conservação de espécies ameaçadas de extinção. Cuidados especiais, entretanto, devem ser considerados em relação à correta amostragem do germoplasma a ser conservado com vistas a conservar genótipos que sejam representativos da variabilidade genética das espécies alvo (ENGELMANN, 1998).

Outra vantagem dessa técnica, é que permite o rápido retorno das culturas às condições de crescimento normal, podendo atender a demanda de material vegetal. Embora seja utilizado com sucesso para conservação de diversas culturas em curto e médio prazo, o sistema de crescimento lento é ineficiente para conservação em longo prazo, sobretudo em função do risco de seleção, como consequência do estresse imposto durante a estocagem e de ocorrência de variação somaclonal (LYNCH, 1999).

Um dos problemas da conservação *in vitro* pode ser o alto custo com mão-de-obra, já que é necessário realizar repicagens periódicas para a manutenção do material (SALOMÃO *et al.*, 1997), ainda que estes custos sejam menores do que a manutenção de um BAG no campo.

A conservação em médio prazo se dá pela manutenção das plantas em condições de crescimento lento ou crescimento mínimo, o que pode ser obtido pela redução no metabolismo e conseqüente redução nas taxas de crescimento, permitindo períodos mais prolongados entre subcultivos e diminuindo a necessidade de intervenção de mão de obra.

A adoção de algumas estratégias como a redução da temperatura e da luminosidade nas salas de crescimento, alterações no meio de cultivo, mais precisamente na redução de macro e micronutrientes, sacarose e uso de agentes retardantes de crescimento, podem produzir condições favoráveis para a conservação *in vitro*, pela diminuição significativa no número de repicagens e na extensão do intervalo entre os subcultivos.

A eficácia desta técnica varia de acordo com as características fisiológicas da espécie a ser conservada. Geralmente os explantes mais indicados para a conservação *in vitro* são os de origem meristemática, já que suas células são mais resistentes às baixas temperaturas e esses tecidos também apresentam maior estabilidade genética e qualidade fitossanitária (AMARAL *et al.*, 2007). *Vriesea reitzii* Leme & Costa (RECH FILHO *et al.*, 2005), *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata* (MOREIRA, 2008) são algumas das poucas espécies de Bromeliaceae estudadas com vistas à conservação *in vitro* que ainda é bastante escassa para plantas dessa família.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de protocolos de germinação de sementes *in vitro* e micropropagação de *A. blanchetiana* e *A. distichantha*, visando o processo de produção de mudas em larga escala (Capítulo 1) e o estabelecimento das condições mais adequadas de conservação *in vitro* para essas espécies e para a espécie *A. leptantha* (Capítulo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L.; VEIGA, R. F. A.; TOMBOLATO, A. C. F; BARBOSA, W. C.; CONAGIN, A. Conservação *in vitro* de germoplasma de três cultivares de amarílis (*Hippeastrum* Herb.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 113-120, 2007.

ANUÁRIO BRASILEIRO DAS FLORES 2007. Santa Cruz do Sul, RS: Editora Gazeta Santa Cruz, 2007.

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 11, p. 1081–1089, 2002.

BATALHA, M. O.; BUAINAIN, A. M. **Cadeias produtivas de flores e mel**. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007.

BRAINER, M. S. C. P.; OLIVEIRA, A. A. P. **Floricultura**: perfil da atividade no nordeste brasileiro. (Série Documentos do ETENE, n.17). Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007.

CANTO, A.M.E.; SOUZA, F.V.D.; COSTA, M.A.C.C; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; CABRAL, J.R.S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

CARNEIRO, L. A. & MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, Viçosa, v. 2, n. 1, p.12-20, 2004.

COFFANI-NUNES, J. V. **Bromélias**. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Org.). **Sustentável Mata atlântica: a exploração de recursos vegetais**. São Paulo: Senac, 2002. p. 119-132.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York Botanic Garden, New York, 2ª ed, 1988. 555 p.

DROSTE, A.; SILVA MACHADO, A. da; 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**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

ENGELMANN, F. *In vitro* germplasm conservation. In: DREW, R.A. [ed.]. **Tropical & Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/Embrapa – CNPH, 1998. p. 41- 47.

FIGUEIREDO, M. L. **Desenvolvimento de protocolos para propagação in vitro de três espécies de Bromeliácea nativas do Brasil**. 2003. 68p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa - MG.

FLORIDATA. ***Aechmea distichantha***. Disponível em: <http://www.floridata.com/ref/A/aech_dis.cfm>. Acesso em 12 de julho de 2009.

FORZZA, R. C.; WANDERLEY, M. G. L. Pitcairnioideae (Bromeliaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica (USP)**, São Paulo, v. 17, p. 255-270, 1998.

FORZZA, R. C. Revisão Taxonômica de *Encholirium Mart.* Ex. Schult. & Schult. F. (Pitcaimioideae – Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, n. 1, p.1-49, 2005.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Desenvolvimento '*in vitro*' de plântulas de bromélia: sacarose e concentração do meio MS. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 7, n. 2, p. 55-63, 2002.

FRAZÃO, J. G. S. **Contribuição de características citogenéticas e moleculares à sistemática de Bromeliaceae**. 2006. 115p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

GALVANESI, M. S.; TAVARES, A. R.; AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; CHU, E. P.; STANCATO, G. C.; HARDER, I. C. F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 311, p. 63-67. 2007.

GIACOMETI, D. C.; GOES, M. de. Conservação de germoplasma de espécies frutíferas pelo uso da biotecnologia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 8, n. 3, p. 39-46, 1993.

GILMAN, E. F. *Aechmea distichantha*. Disponível em: <<http://hort.ufl.edu/shrubs/AECDISA.PDF>>. Acesso em 12 de julho de 2009.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ. p.183-260. 1998.

IBAMA: **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. In: Nº06. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/wp-content/files/IN_06_Lista_Spp_Flora_Ameacada_de_Extincao.pdf>. Acesso em 11 de janeiro de 2010.

JONES, J. B. & MURASHIGE, T. Tissue culture propagation of *Aechmea fasciata* Baker and other bromeliads. **International Plant Propagators Society Combined Proceedings**, v. 24, p. 117-127, 1974.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtores da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇÁLVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. Cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

LYNCH, P. T. Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. In: BENSON, E. E. (ed). **Plant Conservation Biotechnology**. UK: Taylor & Francis, Dundee. p. 41-55. 1999.

LORENZI, H. & SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2 ed. Nova Odessa, Plantarum. 719 p. 1998.

LUTHER, H. E. *Neuregelia johnsoniae*, an extraordinary new specie from Eastern Peru. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 39, p.70-71, 2006.

MAPES, O. M. Tissue culture of bromeliads. **International Plant Propagators Society Combined Proceedings**, v. 23, p. 47-55, 1973.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F. da; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.59, n.1, p.209-258. 2008.

MELO, N. F.; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107. 1999.

MENDES, G. C.; SOARES, C. Q. G.; BRAGA, V. F.; PINTO, L. C.; SANTANA, R.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 972-974, jul. 2007.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - BA.

MOREIRA, B. A.; WANDERLEY, M. G. L.; CRUZ-BARROS, M. A. V. da. **Bromélias: importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia. Relatório** (Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, São Paulo, 12 p., 2006.

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

NADKARNI, N. M. The conservation of epiphytes and their habitats: summary of a discussion at the international symposium on the biology and conservation of epiphytes. **Selbyana**, Sarasota, n.13, p.140- 142, 1991.

PAULA, C. C. de. **Cultivo de Bromélias**. Editora Viçosa: Aprenda fácil, 139p., 2000.

PAULA, C. C. de; SILVA, H. M. P. da. **Cultivo prático de Bromélias**. Editora UFV, Viçosa. 73p. 2001.

RAUH, W. **Bromeliads for home, gardens and greenhouses**. London: Blandford Press, 1979. 58 p.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004. 87p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the

Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 14, p. 1799–1808, 2005.

SALOMÃO, A. N.; EIRA, M. T. S.; CUNHA, R. da; SANTOS, I. R. I.; MUNDIM, R. C.; REIS, R. B. **Padrões de germinação e comportamento para fins de conservação de sementes de espécies autóctones: madeireiras, alimentícias, medicinais e ornamentais.** (Embrapa - Cenargen. Comunicado técnico, 23), Brasília, 12 p. 1997.

SANTOS, D. S. dos. **Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno.** 2009. 121p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

SANTOS, O. S. N.; SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H. Germinação *in vitro* de sementes de *Aechmea sp.* In: 16° Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 3° Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas e 1° Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas, 2007, Goiânia. **Revista Brasileira de Horticultura.** Goiânia: Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, v. 13, p. 1585-1588, 2007.

SCHERER, A. M. S. As flores da Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador. v. 7, p. 9-13, 2006.

SILVA, A. L. L. da; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; GESING, J. P. A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Heringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 63, n. 1, p. 135-138, 2008.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 4, p. 923-932, 2009.

SIQUEIRA FILHO, J. A. & LEME, E. M. C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste – Biodiversidade, conservação e suas bromélias**, Rio de Janeiro: Andréa Jakobsson Estúdio, 360 p., 2006.

SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. Monograph Pitcairnoideae. (Bromeliaceae). **Flora Neotropical**, The New York Botanical Garden, New York, v. 14, n. 1, p. 1-658, 1974.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação de abacaxizeiro e outras bromélias. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Eds.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p. 177-205. 2009.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P; BARROSO, T. C. S. F. **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 225p.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M de. Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARESINGLIS, M. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rodanópolis: Fundação MT, p. 124-147, 2001.

WITHERS, L. A. & WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v. 1, p. 297-330, 1998.

CAPÍTULO 1

Micropropagação de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith e *Aechmea distichantha* Lemaire¹

¹ Este capítulo será submetido à Revista Horticultura Brasileira.

RESUMO

Aechmea blanchetiana (Baker) L. B. Smith e *Aechmea distichantha* Lemaire, são bromélias nativas e ornamentais, obtidas principalmente através do extrativismo predatório, o que pode levar a uma erosão genética das espécies. Este trabalho teve como objetivo avaliar a germinação de sementes *in vitro* e estabelecer protocolos de micropropagação destas bromélias, visando à produção de mudas para atender as recentes demandas do mercado. Sementes de frutos maduros das duas espécies foram germinadas em meio de cultura MS em presença e ausência de luz. As plantas obtidas *in vitro* em presença de luz, foram multiplicadas em meio MS e usadas como explante para avaliar o efeito de diferentes combinações e concentrações dos reguladores vegetais BAP e CIN (2,2 e 4,4 μM), e ANA (0,05 e 0,5 μM) no número médio de brotos. A presença de luz favoreceu a germinação *in vitro* de *A. blanchetiana* e *A. distichantha*, que apresentaram porcentagens de germinação superiores a 60%. O meio MS suplementado com 0,5 μM ANA + 2,2 μM BAP, promoveu a melhor taxa de multiplicação para ambas as espécies. O BAP promoveu a formação de brotos sem raízes, enquanto a cinetina favoreceu a formação de raízes em detrimento de brotações.

Palavras-chave: Bromeliaceae. Cultura de tecidos. Taxas de multiplicação.

ABSTRACT

Aechmea blanchetiana (Baker) L. B. Smith and *Aechmea distichantha* Lemaire are ornamental and native bromeliads obtained mainly through the predatory extraction, which can lead to the genetic erosion of these species. This study aimed to establish protocols for micropropagation of these bromeliads, aiming the production of seedlings to supply the recent demand of the market. Mature seeds of both species were cultivated on MS medium in the presence or absence of light to perform the *in vitro* germination. The *in vitro* plantlets were cultivated on MS medium to obtain plants to use as explants in order to evaluate the effect of different combinations and concentrations of plant growth regulators, like BAP and KIN (2.2 and 4.4 μM) with NAA (0.05 and 0.5 μM) in shoot multiplication of these species. Seeds of *A. blanchetiana* and *A. distichantha* present a positive photoblastic behavior with percentages of germination above 90%. MS medium supplemented with 0.5 μM NAA + 2.2 μM BAP provided the best *in vitro* multiplication rate for both species. BAP promoted the formation of shoots without roots, while kinetin favored the formation of roots at the expense of the number of shoots

Keywords: Bromeliaceae. Tissue culture. *In vitro* multiplication rate.

1.1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é dividida em três subfamílias: a Pitcarnioideae, a Tillandsioideae, e a Bromelioideae (FERREIRA *et al.*, 2005). Possui cerca de 56 gêneros e aproximadamente 3.086 espécies (LUTHER, 2006). No Brasil são encontrados cerca de 40 gêneros e 1.500 espécies, sendo 40% nativas. Ocorre praticamente em todo território nacional, de Norte a Sul e em todos os ecossistemas, sendo que na região Sudeste apresenta maior diversidade, principalmente, na região da Mata Atlântica (PAULA & SILVA, 2004), destacando o país como o mais biodiverso em Bromeliaceae (LEME, 2003; FORZZA, 2005).

O gênero *Aechmea* é um dos maiores da família, pertence à subfamília Bromelioideae e possui cerca de 200 espécies. A maioria das bromélias desse gênero exibe rosetas vistosas e as inflorescências são compostas por brácteas coloridas, que mantêm a intensa coloração por várias semanas ou até meses, conferindo a essas espécies alto potencial ornamental como em *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith e *Aechmea distichantha* Lemaire (TERAO *et al.*, 2005).

A. blanchetiana é uma bromélia terrestre, nativa do Brasil, endêmica dos Estados da Bahia e Espírito Santo, comuns nas Restingas e na Mata Atlântica (KANASHIRO *et al.*, 2007; MARTINELLI *et al.*, 2008). É herbácea, perene, rizomatosa, robusta, com folhagem e inflorescências decorativas de 60 a 90 cm de altura (LORENZI & SOUZA, 1998). Suas folhas amarelo-ouro e inflorescência composta por um conjunto de brácteas vermelhas chegam a durar diversos meses, conferindo, assim, a essa espécie, além de um grande potencial ornamental, uma boa durabilidade pós-colheita (GILMAN, 2009a). O seu uso crescente em paisagismo de jardins tem gerado uma demanda para o mercado, colocando essa espécie em constante ameaça. De acordo com Leme & Marigo (1993) essa espécie vem sendo criminosamente extraída de seu ambiente natural para atender a essa demanda.

A. distichantha é uma espécie típica do Cerrado brasileiro, nativa do sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai, de hábito epífita, saxícola ou terrestre, possui roseta ereta de folhas arqueadas de até 90 cm de altura, que floresce apenas uma vez por ano entre os meses de novembro a março, com

durabilidade de até um mês (FLORIDATA, 2009; GILMAN, 2009b). Da mesma forma que a *A. blanchetiana*, não é cultivada e vem sendo utilizada no mercado de plantas ornamentais como resultado de atividades extrativistas, o que a colocou na categoria de ameaça como espécie vulnerável à extinção (MARTINELLI *et al.*, 2008).

A comercialização de bromélias para fins ornamentais cresceu muito no final do século XX, conquistando a preferência dos paisagistas e consumidores. Características como fácil adaptação, beleza, originalidade, durabilidade e versatilidade, tornam as espécies dessa família cada vez mais apreciadas para ornamentações de interiores e exteriores. Todavia, a maioria das espécies ornamentais, ou mesmo com potencial ornamental, é proveniente do extrativismo predatório, ocasionado pelo fácil acesso desses materiais na natureza e pela crescente demanda que não atende o mercado (BERED *et al.*, 2007).

Considerando esse contexto, a produção de mudas para atender o mercado é uma estratégia importante para minimizar as atividades extrativistas. Estudos relacionados ao sistema de propagação dessas espécies são necessários, a fim de subsidiar o estabelecimento de protocolos eficientes e que possam garantir uma produção em larga escala desses materiais.

Por outro lado, a clonagem de espécies pouco estudadas consiste em uma ameaça à manutenção da variabilidade genética das populações naturais e à conservação desses germoplasmas, podendo causar uma erosão genética irreversível. Em vista disso, a propagação de plantas por meio de sementes é a mais indicada, em casos como esses (SILVEIRA *et al.*, 2009), uma vez que assegura a manutenção da variabilidade genética, além de gerar um grande número de plantas-matrizes, evitando a perda de genes (MERCIER & NIEVOLA, 2003; CARNEIRO & MANSUR, 2004).

A propagação *in vitro* tem demonstrado grande potencial em relação às técnicas convencionais, pois permite multiplicação rápida e geneticamente confiável de um elevado número de plantas, que pode atender à elevada demanda do mercado (VILLALOBOS & THORPE, 1991). No que se refere às bromélias, a propagação *in vitro* tem sido empregada com sucesso na produção de mudas em larga escala, com destaque para o estabelecimento de diversos protocolos de diferentes espécies (ARRABAL *et al.*, 2002; RECH FILHO *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008, SILVEIRA *et al.*, 2009).

Vários fatores podem influenciar as diferentes etapas para o estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação. O meio de cultura é um dos principais fatores, uma vez que determina o crescimento e desenvolvimento das plantas (GRATTAPAGLIA & MACHADO 1998). O meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com auxinas e citocininas, como ácido naftalenoacético (ANA), cinetina (CIN) ou benzilaminopurina (BAP) em diversas concentrações são os mais utilizados para a micropropagação de bromélias (SOUZA *et al.*, 2003; DROSTE *et al.* 2005; BELLINTANI, *et al.* 2008), considerando as diferentes etapas. Como em outras espécies, a necessidade de protocolos específicos, se deve, principalmente, a genótipo-dependência que pode existir, demandando otimização desses protocolos para a obtenção de um resultado eficiente.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a germinação de sementes *in vitro* e desenvolver protocolos de micropropagação das bromélias ornamentais *A. blanchetiana* e *A. distichantha* a partir das plantas *in vitro*, avaliando o efeito de diferentes concentrações dos reguladores vegetais na etapa de multiplicação.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA.

1.2.1 Germinação *in vitro* de *A. blanchetiana* e *A. distichantha*

Sementes obtidas de bagas maduras de *A. blanchetiana* coletadas em março de 2008 na Fazenda Flor de Brotas em Irará, BA e sementes retiradas de bagas maduras de *A. distichantha*, coletadas em janeiro de 2008 no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, foram desinfestadas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. As sementes foram inicialmente lavadas para a retirada de qualquer resíduo e colocadas em uma solução de etanol a 70% por 5 minutos, seguido de imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio contendo 2% de cloro ativo com três gotas

do detergente Tween-20[®] por 100 mL, durante 30 minutos, e enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada. A inoculação das sementes foi em placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®], pH ajustado em 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Após essa etapa, foram incubadas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol.m⁻².s⁻¹ e em ausência de luz. A germinação foi avaliada diariamente e encerrada quando o número de sementes germinadas tornou-se constante por um período de cinco dias. Considerou-se a semente germinada quando houve a emissão da radícula. Após esse período, avaliou-se a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, a porcentagem total de germinação e a germinação cumulativa. As médias obtidas da porcentagem de germinação foram transformadas em arc-seno √% germinação/100 e comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2004).

Foram considerados dois experimentos separados, um para cada espécie, sendo o delineamento utilizado inteiramente casualizado, com dois tratamentos (presença e ausência de luz). Para a espécie *A. blanchetiana* cada tratamento foi composto de sete repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa com 15 sementes. Para *A. distichantha* cada tratamento foi composto por oito repetições e cada repetição por 15 sementes.

1.2.2 Multiplicação *in vitro* de brotos adventícios de *A. blanchetiana* e *A. distichantha*

As plantas com aproximadamente 60 dias, obtidas da germinação *in vitro* na presença de luz, oriundas do experimento anterior, foram limpas (removendo as raízes e tegumento residual da semente) e mantidas em tubos de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL de meio de cultura MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®], em que permaneceram por mais 60 dias para o desenvolvimento das plantas. Após esse período, as plantas foram reduzidas a um tamanho de aproximadamente 1 cm, retirando todas as folhas e raízes, deixando-se apenas o caule, a fim de tornar homogêneo o material de partida, e utilizadas como explante para o estabelecimento desse experimento. As plantas

foram distribuídas em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com todas as combinações entre as concentrações de 0,05 e 0,5 µM de ANA (ácido naftalenoacético) com 2,2 e 4,4 µM de BAP (6-benzilaminopurina) e CIN (cinetina). O meio de cultura foi solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®], pH ajustado em 5,8 e autoclavado por 20 minutos na temperatura de 121°C. Além disso, foi adicionado um tratamento que serviu como controle, em que as plantas de cada espécie foram cultivadas no mesmo meio sem a presença dos reguladores vegetais.

Foram realizados três subcultivos, em intervalos de 45 dias, tendo sido efetuada a subdivisão longitudinal dos brotos sempre que possível. As plantas foram incubadas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 30 µmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (concentrações de ANA) x 2 (citocininas) x 2 (concentrações de citocininas) + 1 (testemunha), com 10 repetições por tratamento, em que cada repetição se constituiu de uma planta por frasco. Avaliou-se o número médio de brotos por tratamento em cada subcultivo. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% e posteriormente comparadas com a testemunha pelo teste de Dunnett a 5%, que consistiu na comparação de cada tratamento com o controle (meio de cultura sem nenhum regulador de crescimento), após serem transformadas em log (x + 10) a fim de se corrigir desvios na distribuição normal dos dados. Utilizou-se o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2004).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Germinação *in vitro* de *A. blanchetiana* e *A. distichantha*

Sementes de *A. blanchetiana* só apresentaram contaminação fúngica (14,3%) quando cultivadas em presença de luz nos 10 primeiros dias de cultivo e não houve contaminação bacteriana em nenhum dos experimentos realizados. Já para as sementes de *A. distichantha* não foi verificada nenhuma contaminação fúngica nem bacteriana nas condições de cultivo estabelecidas. Apesar da contaminação fúngica registrada em *A. blanchetiana* o tratamento de desinfestação utilizado pode ser considerado eficiente.

Estudos com germinação de sementes de bromélias apresentaram resultados semelhantes à das duas espécies analisadas, demonstrando que não há maiores problemas para a desinfestação das sementes, de uma maneira geral (GALVANESI *et al.*; 2007; FIGUEIREDO, 2003; SANTOS, 2009). A contaminação fúngica registrada em *A. blanchetiana* pode estar relacionada com a assepsia e o manuseio das sementes durante a inoculação. Fortes *et al.* (2004) citam que no cultivo *in vitro* a presença de fungos, apesar de causar danos, não é tão importante como a de bactérias, visto que evitar sua ocorrência é uma questão de ajustar a assepsia do material, enquanto que as ocorrências de bactérias, principalmente se forem de origem endofítica, implica em um controle mais complexo. Embora algumas possam ser patogênicas, muitas são encontradas no solo como saprófitas, ou nas plantas como flora endofítica e após o estabelecimento *in vitro* podem interferir no crescimento e conduzir a cultura de plantas à morte (CORRÊA, 2004).

Apesar de ser comum a presença de microrganismos endofíticos nos tecidos vegetais de bromélias e se constituírem na principal causa de perda de material vegetal, em sementes, poucos registros foram feitos sobre contaminação bacteriana *in vitro* (PEREIRA *et al.*, 2003). A maioria dos protocolos de propagação de bromélias que utiliza sementes como fonte de explante (NIEVOLA *et al.*, 2001; RECH FILHO *et al.*, 2005; PICKENS *et al.*, 2006; BELLINTANI *et al.*, 2008; SILVEIRA, *et al.* 2009; SOUZA *et al.*, 2009) não relata a porcentagem de contaminação.

A porcentagem total de sementes germinadas de ambas as espécies, apresentou diferenças significativa em relação às condições de luminosidade (Tabela 1). A taxa de germinação de sementes de *A. blanchetiana* foi maior, em ambas as condições de cultivo, quando comparada com a germinação de *A. distichantha*. Contudo, as sementes germinadas em presença de luz, nas duas espécies apresentaram taxas de germinação significativamente superior (98,85% e 62,09%) em relação às sementes germinadas em ausência de luz (93,74% e 46,51%), deixando evidente que a presença de luz favoreceu a germinação *in vitro* de ambas as espécies.

Tabela 1. Porcentagem total de germinação *in vitro* de sementes de *A. blanchetiana* avaliada aos 25 dias e *A. distichantha*, avaliada aos 45 dias de inoculação em duas condições de cultivo.

Espécies	Germinação (%)	
	Presença de luz	Ausência de luz
<i>A. blanchetiana</i>	98,85 a	93,74 b
<i>A. distichantha</i>	62,09 a	46,51 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O início da germinação para *A. blanchetiana* iniciou cinco dias após a semeadura, independente das condições de luminosidade, sendo que a germinação estendeu-se até o 10º dia após a semeadura para as sementes germinadas na presença da luz e até 15º dia para as sementes cultivadas no escuro (Figura 1).

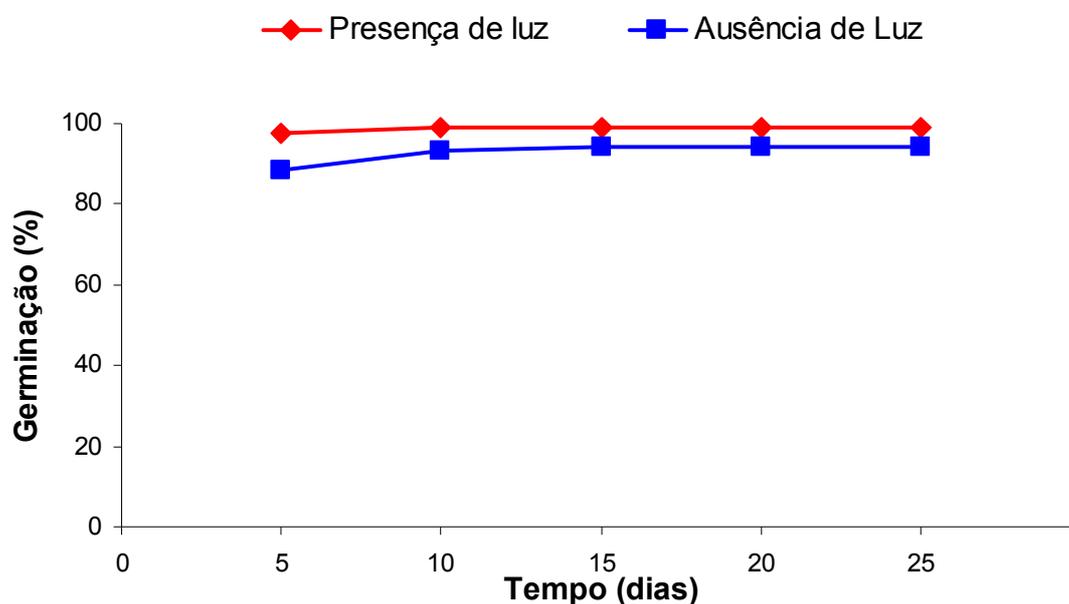


Figura 1. Germinação cumulativa *in vitro* de sementes de *A. blanchetiana* em duas condições de cultivo.

No caso de *A. distichantha*, observou-se que a protrusão da radícula também teve início no quinto dia após a sementeira. Contudo, a finalização ocorreu entre o 35° e o 40° dia na presença e ausência de luz, respectivamente (Figura 2).

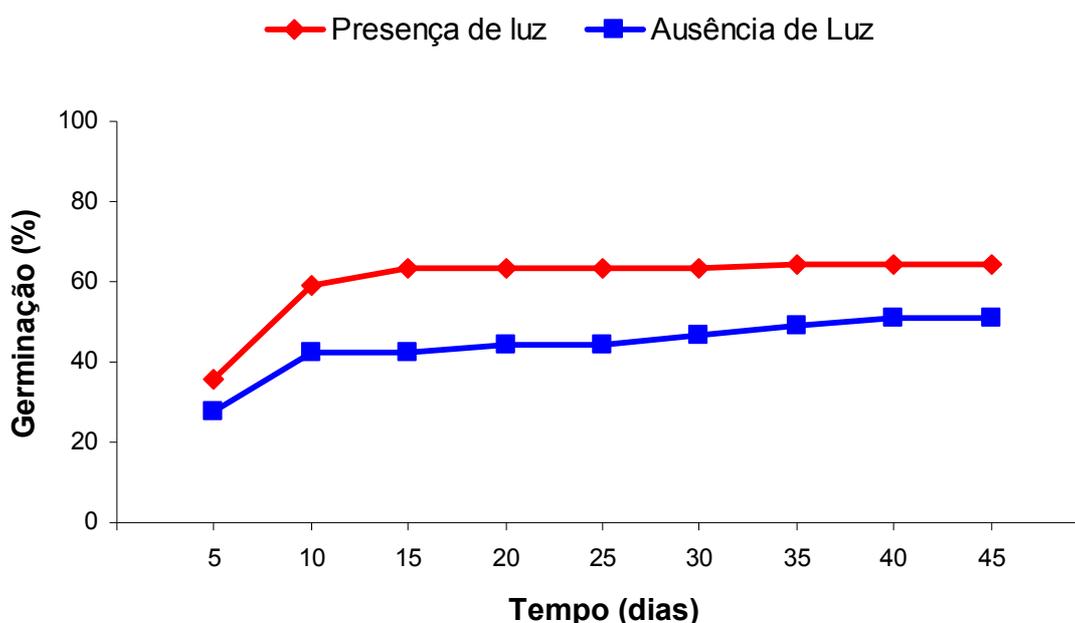


Figura 2: Germinação cumulativa *in vitro* de sementes de *A. distichantha* em duas condições de cultivo.

Silveira *et al.* (2009) também observaram diferença na taxa de germinação de sementes de *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez., ao germinarem sementes oriundas de frutos maduros e imaturos nas mesmas condições de luminosidade utilizadas neste trabalho, sendo que as melhores taxas de germinação foram obtidas em presença de luz, 100% e 80% com emissão da radícula no 10° e 15° dia para as sementes maduras e imaturas, respectivamente. Diversos trabalhos relatam taxas de germinação, entre 90 – 100%, ocorrendo em até uma semana após a inoculação (BELLINTANI *et al.*, 2007; BENCKE & DROSTE, 2008; SILVA, 2008). Esses resultados, bem como os encontrados nesse trabalho, demonstram que a presença de luz favorece a porcentagem e a velocidade de germinação de diferentes espécies de bromeliáceas.

A resposta à luz pode se manifestar por um incremento na germinação (fotoblastismo positivo), enquanto para outras espécies a ausência de luz é o que

promove a germinação (fotoblastismo negativo) (ROSA & FERREIRA, 2001). Mercier & Nievola (2003) citam que as sementes de bromélias, em geral, são fotoblásticas positivas e em presença de luz as moléculas de fitocromo, presente nas sementes, reagem rapidamente passando da forma inativa para ativa. Quando as sementes apresentam o fitocromo A, podem germinar tanto na presença, quanto na ausência de luz, enquanto, quando o fitocromo B está presente na semente, ela só germina com a presença da luz (SOCOLOWSKI & TAKAKI, 2004). Provavelmente, o fitocromo A está presente em *A. blanchetiana* e *A. distichantha*, explicando a reação mais rápida em presença de luz.

Sabe-se que a água e a temperatura, bem como outros fatores interagem, podendo interferir nos processos metabólicos que desencadeiam a germinação de sementes. Além disso, a diferença na resposta germinativa pode ser devido a características genéticas inerentes a cada espécie. A germinação *in vitro* dessas espécies demonstrou ser bastante eficiente, uma vez que seu desenvolvimento partindo de sementes gerou plantas saudáveis, morfologicamente normais e vistosas em um período de 25 dias para *A. blanchetiana* e 45 dias para *A. distichantha* (Figura 3).

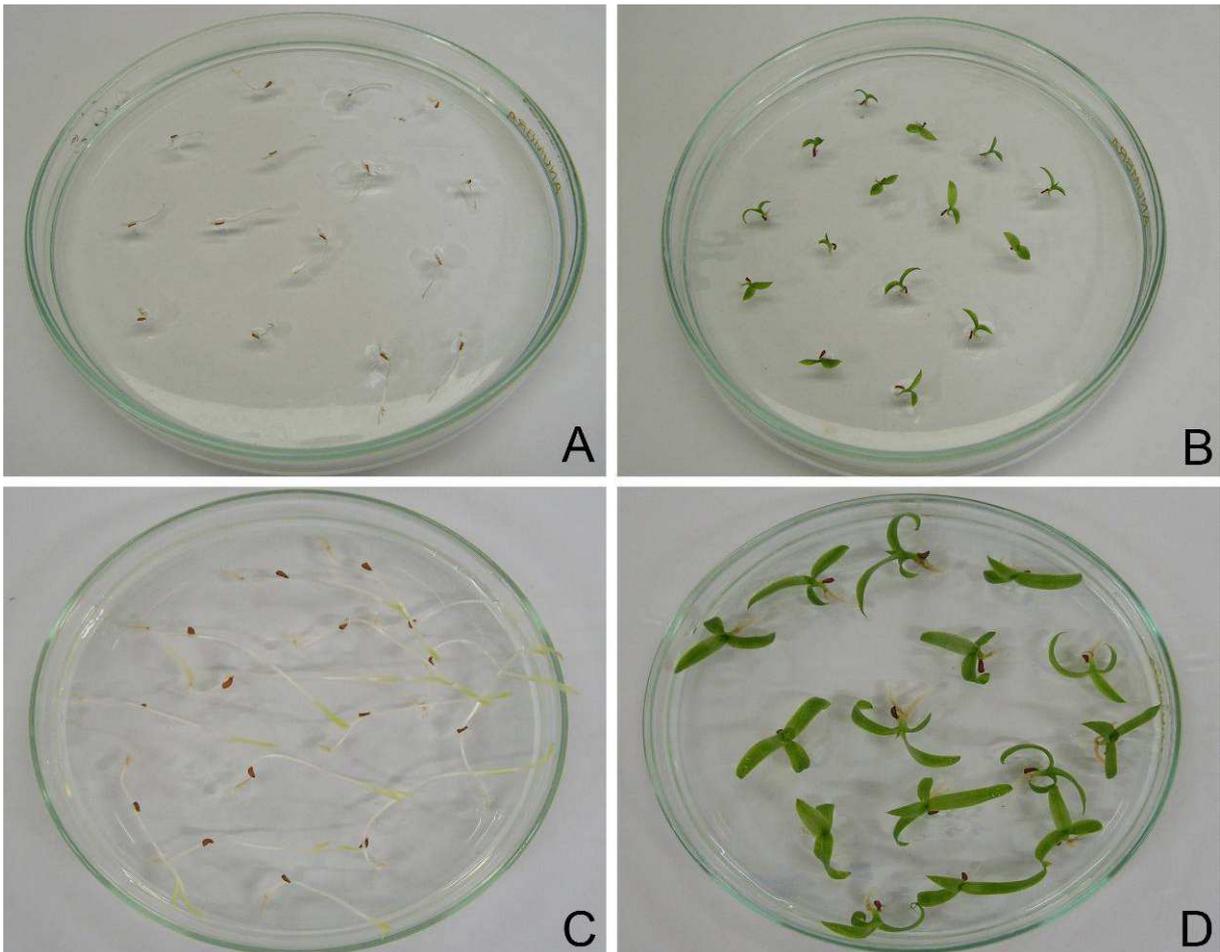


Figura 3. Germinação *in vitro* de sementes de *A. blanchetiana* aos 25 dias de cultivo em ausência (A) e presença de luz (B) e de *A. distichantha* aos 45 dias de cultivo em ausência (C) e presença de luz (D).

1.3.2 Multiplicação *in vitro* de brotos adventícios de *A. blanchetiana* e *A. distichantha*

A formação de brotos adventícios foi observada em todos os tratamentos para as duas espécies estudadas. No entanto, houve diferenças no número médio de brotos das espécies em função dos fatores estudados. Para a espécie *A. blanchetiana*, somente o tipo de citocinina influenciou no número médio de brotos após o terceiro subcultivo (Tabela 2), sendo que a melhor resposta para essa variável (38,50) foi encontrada na presença do BAP independentemente das concentrações utilizadas neste estudo (Tabela 3).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para o número médio de brotos de *A. blanchetiana* após o terceiro subcultivo.

Fontes de variação	GL	QM
Concentração de ANA (CA)	1	0,010 ^{ns}
Citocinina (CT)	1	1,154*
Concentração de citocinina (CC)	1	0,001 ^{ns}
CA x CT	1	0,000 ^{ns}
CA x CC	1	0,086 ^{ns}
CT x CC	1	0,173 ^{ns}
CA x CT x CC	1	0,208 ^{ns}
Resíduo	65	0,055
CV (%)		16,982
Média Geral		1,385

^{ns}, * não significativo e significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Tabela 3. Número médio de brotos de *A. blanchetiana* após o terceiro subcultivo.

Citocinina	Nº de brotos
BAP	38,50 a
CIN	11,00 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Já para a *A. distichantha* o efeito da concentração de ANA (CA), o tipo de citocinina utilizada (CT), a concentração da citocinina (CC), bem como a interação citocinina e sua concentração (CT x CC) influenciaram nos resultados obtidos na multiplicação de brotos adventícios (Tabela 4), deixando evidente que cada espécie apresenta uma resposta morfogênica diferente em relação às mesmas condições estabelecidas nesse trabalho.

Tabela 4. Resumo da análise de variância para número médio de brotos de *A. distichantha*, após o terceiro subcultivo.

Fontes de variação	GL	QM
Concentração de ANA (CA)	1	0,381*
Citocinina (CT)	1	8,077*
Concentração de citocinina (CC)	1	0,370*
CA x CT	1	0,108 ^{ns}
CA x CC	1	0,039 ^{ns}
CT x CC	1	0,637*
CA x CT x CC	1	0,150 ^{ns}
Resíduo	77	0,074
CV (%)		15,694
Média Geral		1,730

^{ns}, * não significativo e significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

A concentração de ANA que promoveu os melhores resultados na produção de brotos (104,59) foi a de 0,5 μM (Tabela 5). O desdobramento da interação CT x CC mostrou que a concentração de 2,2 μM de BAP proporcionou a maior produção de brotos, com uma média de 237,30 em contraste com os 108,50 obtidos com o dobro da concentração de BAP. Esses resultados sugerem um efeito inibitório do BAP quando utilizado na maior concentração, diferente do que ocorreu com a CIN. Contudo, esta citocinina apresentou resultados muito inferiores em relação ao BAP (Tabela 6).

Tabela 5. Número médio de brotos de *A. distichantha* em função da concentração de ANA, após o terceiro subcultivo.

Concentração de ANA (μM)	N° de brotos
0,05	98,62 b
0,5	104,59 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Número médio de brotos de *A. distichantha* em função do tipo e concentração de citocinina, após o terceiro subcultivo.

Citocininas	Número de brotos	
	Concentração (μM)	
	2,2	4,4
BAP	237,30 aA	108,50 Ab
CIN	20,89 bA	24,22 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para *A. blanchetiana* o teste de Dunnett mostrou que houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos T2 (0,05 ANA + 4,4 BAP) e T5 (0,5 ANA + 2,2 BAP) e o tratamento controle, sendo que o tratamento T5 foi o que apresentou a maior diferença de número médio de brotos e para *A. distichantha* todos os tratamentos, exceto os tratamentos T3 (0,05 ANA + 2,2 CIN) e T4 (0,05 ANA + 4,4 CIN), apresentaram diferença significativa em relação ao controle (Tabela 7), observando maior diferença de número médio de brotos nos tratamentos T1 (0,05 ANA + 2,2 BAP) e T5 (0,5 ANA + 2,2 BAP). Esse resultado ressalta mais uma vez a diferença na resposta morfogênica *in vitro* de ambas as espécies e a diferença significativa entre o número médio de brotos dos tratamentos com reguladores vegetais em relação ao tratamento sem regulador vegetal.

Tabela 7: Comparação do número médio de brotos de *A. blanchetiana* e *A. distichantha*, entre tratamentos vs. testemunha.

Tratamentos	Diferença entre o n° médio de brotos	
	<i>A. blanchetiana</i>	<i>A. distichantha</i>
T1: ANA (0,05 μM) + BAP (2,2 μM) x T0	63,51 ^{ns}	237,40*
T2: ANA (0,05 μM) + BAP (4,4 μM) x T0	89,71*	92,10*
T3: ANA (0,05 μM) + CIN (2,2 μM) x T0	45,11 ^{ns}	3,52 ^{ns}
T4: ANA (0,05 μM) + CIN (4,4 μM) x T0	51,63 ^{ns}	9,30 ^{ns}
T5: ANA (0,5 μM) + BAP (2,2 μM) x T0	105,62*	223,80*
T6: ANA (0,5 μM) + BAP (4,4 μM) x T0	61,43 ^{ns}	111,50*
T7: ANA (0,5 μM) + CIN (2,2 μM) x T0	46,62 ^{ns}	24,10*
T8: ANA (0,5 μM) + CIN (4,4 μM) x T0	52,51 ^{ns}	24,86*

*Comparação significativa a 5% de probabilidade pelo teste T de Dunnet. ^{ns}: não significativo.

T0: Tratamento testemunha, com ausência de regulador.

Apesar do Teste de Dunnett mostrar diferença significativa entre o contraste das médias dos tratamentos contendo as combinações de ANA e citocininas em relação ao controle, a interação ANA e citocininas não foi significativa para ambas as espécies (Tabela 2 e 4). Assim, o balanço auxina-citocinina não foi um fator significativo para o número de brotos, nas concentrações utilizadas nesse estudo. Outras concentrações ou balanços diferentes desses reguladores devem ser testados em experimentos futuros, uma vez que o aumento na concentração de BAP parece ter exercido um efeito inibidor sobre o número de brotações (Tabela 6). Galvanesi *et al.* (2007) trabalhando com a espécie *A. blanchetiana* obtiveram 138,71 brotos no meio de cultura suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de ANA (25 µM) + 5,0 mg L⁻¹ de BAP (22 µM) em meio líquido e 62,00 brotos no meio contendo 1,0 mg L⁻¹ de ANA (5 µM) + 1,0 mg L⁻¹ de BAP (4,4 µM) em meio semisólido, aos 180 dias de cultivo *in vitro*. Essas concentrações foram muito mais elevadas do que as que foram utilizadas no presente estudo, além do uso de meio líquido e semisólido, e podem explicar os resultados obtidos, sugerindo que essa espécie necessita de maiores concentrações de citocinina para aumentar suas taxas de multiplicação. Estudos realizados com segmentos caulinares de *Billbergia distachia* (Vellozo) Mez por Mendes *et al.* (2007) obtiveram após 90 dias 5,1 e 5,3 brotações em meios contendo as combinações de 1,5 µM de ANA + 5 µM de BAP e 3,0 µM de ANA + 5 µM de BAP, respectivamente. Já Silveira *et al.* (2009) conseguiram obter 60,57 brotos de *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez no meio MS suplementado com 0,5 µM de ANA + 4,4 µM de BAP, após 210 dias de cultivo. Esse resultado é semelhante ao que foi obtido neste trabalho com *A. blanchetiana* (61,43) com o mesmo meio de cultura e a metade do que foi obtido com *A. distichantha* (111,50). De acordo com os resultados a menor concentração do BAP utilizada favoreceu o aumento da multiplicação, provavelmente por constituir um balanço hormonal mais adequado.

Com relação à morfologia dos brotos produzidos, todos os tratamentos proporcionaram brotos normais, sem nenhuma anormalidade morfológica aparente. Todavia os tratamentos contendo BAP, apesar de terem proporcionado o maior número médio de brotos, formaram brotos pequenos sem raiz e/ou em pequena quantidade e pouco desenvolvidas, enquanto os meios com CIN, produziram brotos bem definidos e com um sistema radicular bem desenvolvido (Figura 4), comportamento também relatado por Silveira *et al.* (2009) ao realizar experimentos

de micropropagação de caroá (*Neoglaziovia variegata*) com BAP e CIN nas mesmas concentrações usadas neste trabalho.

Esse comportamento de ambas as citocininas, nas concentrações utilizadas neste trabalho, em relação a algumas bromeliáceas parece estar bem definido e deve estar relacionado com a maior eficiência do BAP em quebrar a dominância apical das plantas no início do cultivo, favorecendo, dessa forma, maior número de brotação lateral, enquanto a cinetina parece favorecer a formação de raízes em lugar de brotações. Contudo, há necessidade de outros estudos com doses maiores de cinetina para confirmar esses resultados.

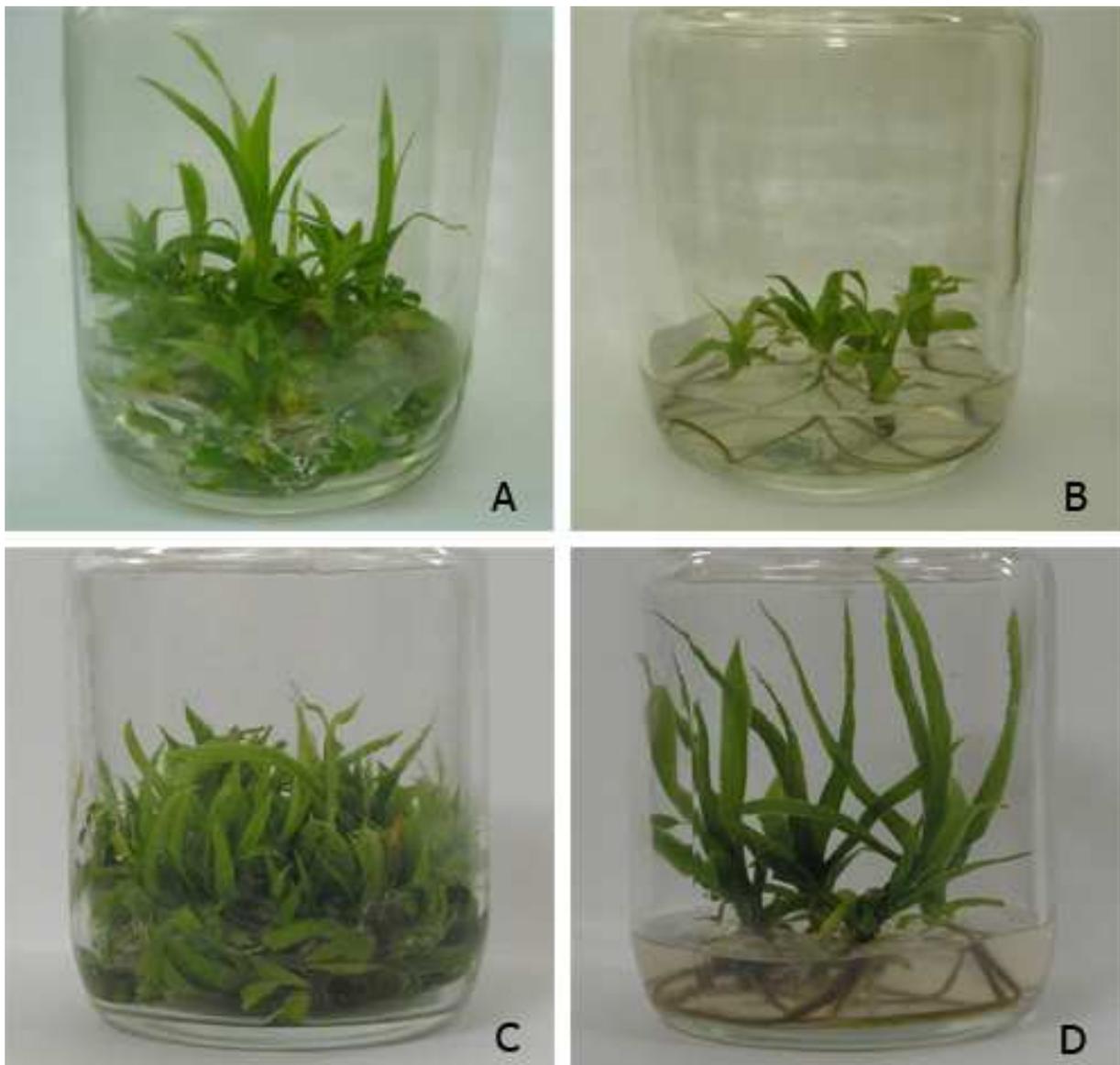


Figura 4. Brotos de *A. blanchetiana* (A e B) e *A. distichantha* (C e D) após o terceiro subcultivo, em meio contendo BAP (A e C) e CIN (B e D).

1.4 CONCLUSÕES

- A presença de luz favoreceu a germinação *in vitro* de *A. blanchetiana* e *A. distichantha*;
- É possível a germinação *in vitro* de *A. blanchetiana* e *A. distichantha* em meio MS;
- A espécie *A. distichantha* apresenta taxas de multiplicação superior a *A. blanchetiana* nas condições estabelecidas nesse trabalho.
- Maiores taxas de multiplicação podem ser obtidas para ambas as espécies, quando multiplicadas em meio MS suplementado com 0,5 µM ANA + 2,2 µM BAP;
- O BAP promoveu a formação de brotos sem raízes, enquanto a cinetina favoreceu a formação de raízes em detrimento do número de brotações para as concentrações utilizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 11, p.1081-1089, 2002.

BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* Neoregelia *mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 1101-1103, 2007.

BELLINTANI, M. C; BRITO, A. L; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Resposta regenerativa *in vitro* de explantes caulinares de bromélias endêmicas da Chapada Diamantina - Bahia. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 4, p. 328 – 337, 2008.

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, n. 59, p. 299-306, 2008.

BERED, F.; SANTOS, E. K. dos; SILVA, C. P. da; PAGGI, G. M. Bromélias – A beleza exótica do Novo Mundo. In: BABIERE, R. H.; STUMPF, E. R. T. (org.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2007, v. 1, p. 235-251.

CARNEIRO, L. A. & MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, Viçosa, v. 2, n. 1, p. 12-20, 2004.

CORRÊA, R. M. **Contaminação em cultura de tecidos**. In: ABCTP Notícias n. 50, 2004.

DROSTE, A.; SILVA MACHADO, A. da; 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**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

FERREIRA F. R.; DUVAL, M. F.; COPPENS D'EECKEMBRUGGE, G.; CABRAL, J. R. S.; BIANCHETTI, L. B. Coleta e uso de germoplasma de abacaxi. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 242-278.

FIGUEIREDO, M. L. **Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de Bromeliácea nativas do Brasil**. 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa - MG.

FLORIDATA. ***Aechmea distichantha***. Disponível em: <http://www.floridata.com/ref/A/aech_dis.cfm>. Acesso em 12 de julho de 2009.

FORTES, G. L.; FREITAS, F. O.; FORTES, M. A.; VALLS, J. F. M. **Sobrevivência de acessos de amendoim (*Arachis hipogaea*) através de germinação *in vitro***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004. 15p.

FORZZA, R. C. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, p. 1-49, 2005

GALVANESI, M. S.; TAVARES, A. R.; AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; CHU, E. P.; STANCATO, G. C.; HARDER, I. C. F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 311, p. 63-67. 2007.

GILMAN, E. F. ***Aechmea blanchetiana***. Disponível em: <<http://hort.ufl.edu/shrubs/AECBLAA.PDF>>. Acesso em 12 de julho de 2009a.

GILMAN, E. F. ***Aechmea distichantha***. Disponível em: <<http://hort.ufl.edu/shrubs/AECDISA.PDF>>. Acesso em 12 de julho de 2009b.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH. p. 183-260. 1998.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇÁLVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. Cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

LEME, E. M. C. Nominal extinction and the taxonomist's responsibility: the example of Bromeliaceae in Brazil. **Taxon**, Utrecht, v. 52, p. 299-302, 2003.

LEME, E. M. C. & MARIGO, L. C. Bromélias na natureza. **Marigo Comunicação Visual**, Rio de Janeiro. 1993. 183 p.

LORENZI, H. & SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2 ed. Nova Odessa, Plantarum. 1998. 719p.

LUTHER, H. E. *Neuregelia johnsoniae*, an extraordinary new species from Eastern Peru. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 39, p. 70-71, 2006.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F. da; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.59, n.1, p.209-258. 2008.

MENDES, G. C.; SOARES, C. Q. G.; BRAGA, V. F.; PINTO, L. C.; SANTANA, R.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 972-974, jul. 2007.

MERCIER, H. & NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 57-62, 2003.

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

NIEVOLA, C. C.; MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. Uréia: uma possível fonte de nitrogênio orgânico para as bromélias com tanque. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 6 n. 4, p. 44-48, 2001.

PAULA, C. C. & SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de bromélia**. Viçosa: UFV, 2004. 106p.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. D. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PICKENS, A. K.; WOLF, J. AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 42, p 348-353, 2006.

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

ROSA, S. C. T. & FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de Plantas Mediciais Lenhosas. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 15, n. 2. p. 147-154, 2001.

SANTOS, D. S. **Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno**. 2009. 121 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 846p., 2004.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; GESING, J. P. A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Heringia**, Porto Alegre, v. 63, n. 1, p. 135-138, 2008.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 4, p. 923-932, 2009.

SOCOLOWSKI, F. & TAKAKI, M. Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don – Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. **Brazilian Archives of Biology and technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 785-792, 2004.

SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; ENDRES, L.; MERCIER, H. Relationships between endogenous hormonal level and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p.733-739. 2003.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação de abacaxizeiro e outras bromélias. In: JUNGHANS, T. G; SOUZA, A. da S. (Eds.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p. 177-205. 2009.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P; BARROSO, T. C. S. F. **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 225p.

VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. **Micropropagación**: concepto, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGISNKI, L. A. (ed.). Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, cap. 6, 1991. p.127-142.

CAPÍTULO 2

Conservação *in vitro* de espécies do gênero *Aechmea*²

² Este capítulo será submetido à revista Plant Cell, Tissue and Organ Culture.

RESUMO

A família Bromeliaceae contém 51 gêneros e 3500 espécies, todas nativas das Américas com exceção de *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Moldboard, nativa da África. O Brasil abriga pelo menos 60% das bromélias do gênero *Aechmea*, cujo valor ornamental tem favorecido a prática extrativista, que pode levar a redução da diversidade genética ou à própria extinção. O uso de diferentes estratégias de conservação deve ser considerado como uma importante forma de conservar essa biodiversidade. A conservação *in vitro* é uma técnica largamente usada para espécies silvestres e cultivada. Como vantagens desse tipo de conservação estão o aumento de vigor da planta, a segurança e a redução dos custos. Visando à conservação *in vitro*, o objetivo desse estudo foi avaliar o crescimento de três espécies de *Aechmea*, potencialmente ornamentais, *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, *Aechmea distichantha* Lemaire e *Aechmea leptantha* (Harms) Leme & J.A. Siqueira. Para isso, foi instalado um experimento em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 3 x 2, em parcela subdividida no tempo, sendo 3 espécies de *Aechmea* (*A. leptantha*, *A. blanchetiana* e *A. distichantha*), 3 concentrações de sais do meio MS (MS, 1/2 MS e 1/3 MS) e 2 ambientes de cultivo, sala de crescimento (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16h) e sala de conservação (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h). A parcela foi constituída pelo fatorial e as subparcelas foram formadas pelas épocas de avaliação (seis e doze meses) e suas respectivas interações. Foram avaliados o comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de brotos (NB). Todas as espécies apresentaram desenvolvimento morfológico normal ao longo do período de conservação. Os melhores resultados foram obtidos com *A. blanchetiana* que apresentou o menor crescimento na sala de conservação. A concentração recomendada é a de 1/3 do MS e os resultados mostraram a possibilidade de se conservar essas espécies durante pelo menos 12 meses em câmara de conservação. A elevada desidratação do meio de cultura em sala de crescimento limitou a conservação a 9 meses nessa condição.

Palavras-chave: Bromélias ornamentais. Cultura de tecidos. Conservação de germoplasma.

ABSTRACT

The Bromeliaceae family contains 51 genera and 3500 species, all of them native to the Americas with the exception of *Pitcairnia Feliciania* (A. Chev.) Harms & Moldboard, which is native to Africa. Brazil has at least 60% of bromeliads from genera *Aechmea*. The ornamental value has favored predatory extrativism and leading this species to threatened conditions. The use of different strategy of conservation must be considered an important way to preservation of this biodiversity. *In vitro* techniques are widely used for germplasm conservation of wild and crop plant species. The advantages of this conservation are improved plant health and reduced costs. This work aimed to evaluate the *in vitro* conservation of three species of *Aechmea*: *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, *Aechmea distichantha* Lemaire and *Aechmea leptantha* (Harms) Helm & J.A. Siqueira under minimum growth. A completely randomized experimental design in a factorial scheme 3 x 3 x 2 in a split-plot (3 species: *A. leptantha*, *A. blanchetiana* and *A. distichantha* x 3 salt concentrations of MS: ½ MS, 1/3 MS and MS x 2 incubation condition: grow chamber and conservation chamber) was used. The plot was constituted by the factorial and subplots were formed by the times of evaluation (six and twelve months). The following parameters were evaluated: length of the aerial part (CPA), number of green leaves (NFV), number of senescence leaves (NFS) and number of shoots (NB). All species presented normal morphologic development during conservation period and the best results was obtained with *A. blanchetiana* that presented the less growth in conservation chamber. The recommended concentration of MS salts was 1/3 MS and results showed the possibility to conserve these species during at least 12 month in the conservation chamber. The high dehydration in the growth chamber limited the conservation period up to 9 month in this conditions.

Keywords: Ornamental bromeliads, Tissue culture, Germplasm conservation.

2.1 INTRODUÇÃO

Bromeliaceae são plantas tropicais nativas das Américas, com exceção de uma única espécie (*Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms e Mildbraed) que ocorre na costa oeste africana. O Brasil abriga mais de 50% das espécies e 80% dos gêneros, sendo 22% deles endêmicos (LEME, 2003; FORZZA, 2005). São encontradas em todos os ecossistemas brasileiros, sendo a Mata Atlântica o ecossistema com a maior diversidade de bromélias (LEME e MARIGO, 1993).

O grande valor ornamental e econômico apresentado por diversas espécies dessa família tem favorecido a prática extrativista, que aliada à destruição dos seus habitats naturais vem reduzindo ou mesmo erradicando muitas espécies nativas, o que, por sua vez, leva de modo exponencial a uma perda de diversas formas de vida, considerando-se que as bromélias têm importante papel na manutenção da biodiversidade (CARNEIRO & MANSUR, 2004; SIQUEIRA FILHO & LEME, 2006). Atualmente, um total de 38 espécies de Bromeliaceae é citado na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção, que apresenta um acréscimo de 23 espécies em relação à lista publicada em 1992 (IBAMA, 2009).

Pelo menos 60% das bromélias do gênero *Aechmea* Ruiz & Pavon são encontradas no Brasil (SIQUEIRA FILHO & LEME, 2006). *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith é endêmica dos estados da Bahia e Espírito Santo, sendo comum nas Restingas e na Mata Atlântica (KANASHIRO *et al.*, 2007; MARTINELLI *et al.*, 2008). A *Aechmea distinchantha* Lemaire é uma espécie típica do Cerrado brasileiro, nativa do sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. Ocorre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (GILMAN, 2009; FLORIDATA, 2009). Finalmente, a *Aechmea leptantha* (Harms) Leme & J. A. Siqueira é uma espécie nativa que ocorre no Nordeste brasileiro, presente em várias formações vegetacionais na Zona da Mata, passando pelo Agreste, em áreas de Caatinga hipoxerófila, até os úmidos Brejos de Altitude nos Estados da Paraíba, Pernambuco e Alagoas (SIQUEIRA FILHO & LEME, 2006; MARTINELLI *et al.*, 2008).

A pesar das três espécies de *Aechmea* não estarem incluídas na Lista de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção, são potencialmente ornamentais e devido a isso são exploradas de forma indiscriminada para atender à

demanda do mercado de plantas ornamentais, colocando essas espécies em constante ameaça (LEME & MARIGO,1993). Essa exploração predatória tem contribuído para que a espécie *A. distichantha* esteja atualmente na categoria de espécies vulneráveis com eminente risco de extinção (MARTINELLI *et al.*, 2008). Por outro lado, a *A. blanchetiana*, por sua vasta ocorrência em zonas de restinga, principalmente na região nordeste, está seriamente ameaçada pelo avanço de grandes construções turísticas, condomínios praianos, entre outros. Esse panorama torna evidente a necessidade de se desenvolver estratégias de preservação e conservação dessas espécies, o mais rapidamente possível.

Os programas de conservação de germoplasma de Bromeliaceae *ex situ* e *in situ*, podem ser realizados a partir do emprego de diferentes estratégias e pelo uso de várias ferramentas de estudo, incluindo estudos genéticos de população, ecológicos, conservação *ex situ* em campo e banco de sementes (ZORNING, 1996).

Dentre as diversas técnicas de conservação *ex situ* a conservação em “campo” é a que vem sendo mais amplamente utilizada para bromélias, por meio de coleções particulares ou em Jardins Botânicos, não apenas no Brasil, mas em vários países, como Inglaterra (Kew Garden), EUA, Holanda, dentre outros.

Entretanto, com o advento da biotecnologia novas estratégias podem ser alternativas interessantes para serem usadas, principalmente como cópia de segurança das coleções que já existem ou para a conservação de espécies ameaçadas. Dentre essas estratégias, a conservação *in vitro*, já vem sendo utilizada com êxito em muitas espécies de importância econômica, como *Musa spp.* (HASSAN, 2004), *Solanum tuberosum* L. (SARKAR *et al.*, 2005), *Manihot esculenta* Crantz (FUKUDA *et al.*, 2005) *Eucalyptus sp.* (BUNN, 2005), *Ananas comosus* (L.) Merrill (SOUZA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2004) e *Saccharum sp* (LEMOS *et al.* 2002), assim como para plantas ornamentais ou ameaçadas de extinção (CARNEIRO *et al.*, 1999; MARTIN & PRADEEP, 2003; BRITO, 2009; LATA *et al.*, 2010).

As vantagens de um BAG *in vitro* são inúmeras e dentre elas, pode-se ressaltar a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que existem no campo ou mesmo em condições de telado e casa de vegetação. Adicionalmente, permite a disponibilização imediata de material para propagação, a manutenção da integridade genética e biológica das plantas, a produção de matrizes livres de patógenos e a

simplificação do intercâmbio de germoplasma, tanto em nível nacional, como internacional (ENGELMANN, 1998; NASS, 2001; RAO, 2004; FARIA *et al.*, 2006).

A conservação *in vitro* é recomendável para bromélias, considerando-se que os estudos necessários sobre a biologia da reprodução e o comportamento das sementes, até o momento, são em número reduzido. Além disso, a manutenção de germoplasma sob diferentes formas é indicada para assegurar a eficácia da prática conservacionista (CARNEIRO & MANSUR, 2004). Estudos visando à conservação *in vitro* de bromélias tem sido relatados para algumas poucas espécies como, *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith (CARNEIRO *et al.*, 1999) *Crypthantus sinuosus* L. B. Smith (ARRABAL *et al.*, 2002); *Vriesea reitzii* Leme & Costa (RECH FILHO *et al.*, 2005), *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, *Aechmea miniata* (Beer) hortus ex Baker (MOREIRA, 2008) e *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez (SILVEIRA *et al.*, 2009).

A obtenção das plantas para a conservação se realiza por meio dos sistemas de micropropagação dos acessos a serem introduzidos. No caso das bromélias é necessário considerar que a amostragem do que será conservado deve corresponder a uma variabilidade genética representativa da espécie. Em vista disso é importante que para o estabelecimento das plantas em condições de laboratório os explantes de partida sejam plântulas germinadas *in vitro*, considerando que cada plântula (originada de uma semente) é uma matriz. Para o futuro estabelecimento do banco *in vitro*, estudos de variabilidade genética de populações serão necessários.

Uma das desvantagens desta técnica, no entanto, é a necessidade de subcultivos periódicos, o que a torna não só laboriosa, mas também onerosa, sendo necessário adequar condições para retardar o crescimento das plantas e diminuir o número de repicagens que devem ser feitas.

Dessa forma, as condições de cultivo normalmente estabelecidas para a conservação *in vitro*, visam à redução do metabolismo celular, influenciando, dessa forma, as taxas de crescimento das plantas, que tem por objetivo aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, reduzindo-se assim a mão-de-obra, os custos e os riscos de variação somaclonal, decorrentes da excessiva manipulação do tecido vegetal (SANTOS, 2008).

A redução da temperatura nas salas de crescimento onde são incubadas as plantas micropropagadas, aliada a diminuição na concentração dos macronutrientes e micronutrientes, têm sido estratégias que, ao serem aplicadas

conjuntamente vêm obtendo sucesso no estabelecimento de condições favoráveis à conservação *in vitro* em várias culturas (LEMOS *et al.* 2002; AMARAL *et al.*, 2007; LÉDO *et al.*, 2007).

A eficácia destas estratégias varia de acordo com as características fisiológicas da espécie a ser conservada. Geralmente os explantes mais indicados para a conservação *in vitro* são os de origem meristemáticas, já que suas células são mais resistentes às baixas temperaturas e esses tecidos também apresentam maior estabilidade genética e qualidade fitossanitária (AMARAL *et al.*, 2007). Por outro lado, a conservação *in vitro* a partir de explantes obtidos de sementes cultivadas *in vitro* permite que a variabilidade genética da espécie seja representada, o que é requerido em programas de conservação.

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a conservação *in vitro* de três espécies de *Aechmea* (*A. leptantha*, *A. blanchetiana* e *A. distichantha*) sob regime de crescimento mínimo na busca de condições adequadas para a formação de um banco *in vitro* de bromélias.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O Trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, localizada em Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

2.2.1 Germinação *in vitro*

Sementes obtidas de bagas maduras de *A. blanchetiana* coletadas em janeiro de 2009 na Fazenda Flor de Brotas, Irará, Bahia, Brasil e de *A. distichantha* e *A. blanchetiana* coletadas em fevereiro de 2009 no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, Bahia, Brasil foram desinfestadas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. O procedimento de desinfestação consistiu da lavagem das sementes para a retirada de qualquer resíduo, posterior colocação em solução de etanol a 70% por 5 minutos, seguido de imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial

contendo 2% de cloro ativo com três gotas do detergente Tween-20[®] por 100 mL, durante 30 minutos, e enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada.

As sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®]. O pH foi ajustado em 5,8 e o meio autoclavado a 121°C por 20 minutos. As placas foram mantidas em sala de crescimento durante 30 dias com temperatura de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

2.2.2 Desenvolvimento *in vitro*

Plantas com 30 dias de idade das três espécies de *Aechmea* obtidas da etapa de germinação *in vitro* foram limpas, pela remoção das raízes e do tegumento residual da semente, sendo posteriormente inoculadas em tubos de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL de meio de cultura MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®]. O pH foi ajustado em 5,8 e o meio autoclavado a 121°C por 20 minutos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹. Aos 60 dias de cultivo, as plantas desenvolvidas, foram usadas para o experimento de conservação.

2.2.3 Conservação *in vitro*

Plantas das três espécies de *Aechmea* obtidas na etapa anterior foram reduzidas a um tamanho de aproximadamente 1 cm, após serem retiradas todas as folhas e raízes, deixando-se apenas o caule, a fim de tornar homogêneo o material de partida. As plantas foram colocadas em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 15 mL de meio de cultura MS em três diferentes concentrações de sais (MS, ½ MS e 1/3 MS), suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®], e mantidas sob duas condições de cultivo, sala de crescimento (temperatura de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16h) e em sala de conservação (temperatura de 22 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 22 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12h).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (espécies) x 3 (meios de cultura) x 2 (condições de cultivo), em parcela subdividida no tempo, com sete repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta por tubo. A parcela foi constituída pelo fatorial e as subparcelas foram formadas pelas épocas de avaliação (6 e 12 meses) e suas respectivas interações. Foram avaliados o comprimento da parte aérea (CPA) em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de brotos (NB), sendo que o CPA foi avaliado aos 3, 6, 9 e 12 meses de conservação.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2004). As variáveis NFV, NFS e NB foram transformadas em $(x + 0,5) \sqrt{0,5}$ visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. Foi calculada a taxa de crescimento geométrico (r) entre os dois períodos de conservação, para a variável CPA, dada pela expressão $(\sqrt[t]{V_f/V_i} - 1) \times 100$, em porcentagem, onde V_f refere-se à avaliação no período de 12 meses, V_i à avaliação no período de 6 meses e t ao período em meses entre as avaliações.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a análise de variância (Tabela 1), as espécies diferiram significativamente quanto ao comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS). As interações duplas espécie (ES) x meio de cultura (ME), espécie (ES) x condição de cultivo (CO) e meio de cultura (ME) x condição de cultivo (CO), foram significativas para as variáveis CPA e NFV; NFV e NFS; e CPA e NFS, respectivamente. Em relação ao efeito do tempo de avaliação (seis e doze meses) sob os fatores espécie, meio de cultura e condição de cultivo, o tempo de conservação *in vitro* (TE) e a interação TE x ES, diferiram significativamente quanto às variáveis em estudo. Nas interações duplas, TE x ME e TE x CO, houve efeito significativo para as variáveis, NFS e CPA e NFS, respectivamente.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de brotos (NB), em função da espécie (ES), do meio de cultura (ME), da condição de cultivo (CO) e do efeito do tempo de conservação (TE), sob esses fatores, na conservação *in vitro* de *A. blanchetiana*, *A. distichantha* e *A. leptantha*.

FV	GL	Quadrado médio			
		CPA	NFV	NFS	NB
ES	2	501,3802**	185,1043**	433,4306**	3,2058 ^{ns}
ME	2	6,6356 ^{ns}	66,3210 ^{ns}	23,8424**	1,7938 ^{ns}
CO	1	1,7159 ^{ns}	46,5763 ^{ns}	1,3613 ^{ns}	2,1680 ^{ns}
ES x ME	4	19,9841**	68,9560*	7,2685 ^{ns}	2,6735 ^{ns}
ES x CO	2	2,0004 ^{ns}	90,4677*	38,6305**	2,5803 ^{ns}
ME x CO	2	29,2387**	41,3511 ^{ns}	20,1047*	1,1663 ^{ns}
ES x ME x CO	4	1,1838 ^{ns}	7,6025 ^{ns}	0,7154 ^{ns}	0,8399 ^{ns}
Erro 1	102	5,2722 ^{ns}	32,5017 ^{ns}	5,6994 ^{ns}	1,9432 ^{ns}
TE	1	334,7882**	22,4826*	1272,2118**	0,7588 ^{ns}
TE x ES	2	14,0151**	85,7404**	98,5786**	0,6860 ^{ns}
TE x ME	2	5,2283 ^{ns}	23,8948 ^{ns}	18,0793*	2,7703 ^{ns}
TE x CO	1	49,1467**	24,4838 ^{ns}	22,4449**	0,4085 ^{ns}
TE x ES x ME	4	2,7076 ^{ns}	17,8693 ^{ns}	11,3463 ^{ns}	2,0113 ^{ns}
TE x ES x CO	2	5,2545 ^{ns}	28,0628 ^{ns}	6,2821 ^{ns}	0,7931 ^{ns}
TE x ME x CO	2	5,6687 ^{ns}	13,5808 ^{ns}	11,1868 ^{ns}	1,6932 ^{ns}
TE x ES x ME x CO	4	1,2590 ^{ns}	11,1796 ^{ns}	4,1049 ^{ns}	1,3978 ^{ns}
Erro 2	98	2,1080	15,6865	4,0947	1,9981
CV (%)		18,17	32,79	58,45	118,72

** ,*, ns. Significativo ao nível de 1% de probabilidade, significativo ao nível de 5% de probabilidade, não significativo pelo teste F, respectivamente.

Todas as espécies apresentaram desenvolvimento morfológico normal ao longo do período de cultivo em ambas as condições de incubação e em algumas plantas foi observado o desenvolvimento de brotos laterais, ainda que em quantidades inexpressivas. Esse reduzido número de brotos já era esperado em vista da formulação do meio, principalmente pela ausência total de reguladores de vegetais, mais especificamente de citocininas. Entretanto, a capacidade de brotação na conservação *in vitro* deve ser considerada e, por isso, há necessidade de se

avaliar esse parâmetro. O excesso de brotações durante o período de conservação demanda mais meio de cultura, promove uma competição com a planta conservada e não é desejável (RECH FILHO *et al.*, 2005). Nesse trabalho, nenhum dos fatores ou suas interações foram significativas para essa variável, ainda que brotações esparsas foram observadas não representando problema (Tabela 1). RECH FILHO *et al.* (2005), trabalhando com a espécie de bromélia *Vriesea reitzii* selecionaram como melhor meio de cultura para a conservação *in vitro* desta espécie o que promoveu as menores taxas de multiplicação, evitando exatamente as brotações excessivas.

Independentemente dos outros fatores, as espécies de *Aechmea* apresentaram diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) em relação as variáveis CPA, NFV e NFS (Tabela 2). Considerando que essas três variáveis são as mais importantes como aferidoras da eficiência do método de conservação *in vitro*, por evidenciarem, de certa forma, a redução do metabolismo nas plantas e seu efeito no crescimento, foi possível constatar que a espécie que apresentou o menor crescimento *in vitro* foi a *A. blanchetiana* com 5,30 cm de comprimento da parte aérea, valor significativamente menor que o encontrado para as espécies *A. distichantha* e *A. lephanta*. Para a variável folhas verdes a relação é praticamente a mesma, ainda que os resultados entre *A. blanchetiana* e *A. distichantha* tenham sido estatisticamente iguais. Dentre os resultados mais expressivos está o que se refere ao número de folhas senescentes (NFS), um dos parâmetros mais importantes na conservação *in vitro*, visto que pode ser um indicativo do envelhecimento da planta conservada e da necessidade de se realizar um novo subcultivo. A espécie que apresentou menor número de folhas senescentes (1,37) foi a *A. blanchetiana* deixando claro que as condições estabelecidas para conservar esta espécie *in vitro* foram favoráveis para reduzir o crescimento, sem, entretanto comprometer o bom desenvolvimento das plantas.

Tabela 2. Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes de espécies de *Aechmea*, na conservação *in vitro*.

Espécie	CPA (cm)	NFV	NFS
<i>A. blanchetiana</i>	5,30 c	10,84 b	1,37 c
<i>A. distichantha</i>	10,16 a	11,71 ab	5,99 a
<i>A. leptantha</i>	8,70 b	13,84 a	3,15 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O desdobramento referente à interação entre as espécies e o meio de cultura pode ser visto na Tabela 3. Apenas a espécie *A. distichantha* teve o comprimento da parte aérea influenciado pelo tipo de meio utilizado na conservação *in vitro*, sendo que o meio que mais favoreceu a redução do crescimento foi o que continha 1/3 dos sais de MS (1/3MS) em sua formulação, que não diferiu estatisticamente do meio com 1/2 MS. Quanto ao número de folhas verdes, a *A. leptantha* foi à única espécie que apresentou diferença estatística, observando-se menor número de folhas verdes em plantas conservadas em meio de cultura com 1/2 da sua concentração (11,46) (Tabela 3). A redução dos sais do MS é uma das estratégias mais utilizadas na conservação *in vitro* de plantas e tem sido utilizada para várias espécies, incluindo várias espécies da família bromeliácea (RECH FILHO *et al.*, 2005; DROSTE *et al.*, 2005; SOUZA & CABRAL, 2004; SOUZA *et al.*, 2006). A utilização de meio de cultura com 1/2 das concentrações de sais do MS, promoveu resultados satisfatórios para a conservação sob crescimento lento da espécie de *Ananás comosus* var. *erectifolius* (= *lucidus*), durante seis meses (SOUZA *et al.*, 2008) e *Aechmea fasciata* e *Aechmae miniata*, durante 12 meses (MOREIRA, 2008).

Tabela 3. Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas verdes (NFV) em função das espécies de *Aechmea* e do meio de cultura, na conservação *in vitro*.

Espécie	CPA (cm)		
	Meio de cultura		
	MS	1/2 MS	1/3 MS
<i>A. blanchetiana</i>	4,66 cA	5,20 bA	6,03 bA
<i>A. distichantha</i>	11,14 aA	10,21 aAB	8,23 aB
<i>A. leptantha</i>	8,98 bA	8,84 aA	9,05 aA
	NFV		
<i>A. blanchetiana</i>	10,48 bA	10,83 aA	10,57 bA
<i>A. distichantha</i>	12,75 abA	10,92 aA	11,38 abA
<i>A. leptantha</i>	15,58 aA	11,46 aB	15,17 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As médias referentes ao desdobramento da interação entre espécie e condições de cultivo podem ser vistas na Tabela 4. O resultado mais expressivo foi em relação ao número de folhas senescentes de *A. blanchetiana*, que apresentou os menores valores quando cultivadas em sala de conservação, evidenciando que essa condição de cultivo é a mais interessante para essa espécie. Para as outras espécies a mudança na condição de cultivo não foi significativa para essa variável. O número de folhas verdes só diferiu significativamente entre as espécies cultivadas na condição da sala de conservação e a *A. leptantha* foi a única espécies que apresentou diferença estatística em relação à condição de cultivo, onde o menor número de folhas verdes foi observado nas plantas conservadas nas condições de sala de crescimento.

Tabela 4. Número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) em função da espécie de *Aechmea* e da condição de cultivo, na conservação *in vitro*.

Espécie	NFV	
	Condição de cultivo	
	Sala de conservação	Sala de crescimento
<i>A. blanchetiana</i>	10,93 bA	10,76 aA
<i>A. distichantha</i>	11,38 bA	12,05 aA
<i>A. leptantha</i>	15,57 aA	12,16 aB
NFS		
<i>A. blanchetiana</i>	0,52 cB	2,24 bA
<i>A. distichantha</i>	6,38 aA	5,58 aA
<i>A. leptantha</i>	3,41 bA	2,89 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No que se refere à interação do meio de cultura com a condição de cultivo, o desdobramento evidenciou uma diferença significativa do crescimento da parte aérea, entre os meios de cultura (Tabela 5), tanto na sala de conservação quanto na sala de crescimento, sendo que o menor comprimento 7,16 cm foi observado para plantas cultivadas em meio com $\frac{1}{2}$ MS em sala de crescimento. Já o número de folhas senescentes só diferiu significativamente entre os meios de cultura quando os cultivos foram mantidos em sala de crescimento, onde o menor valor para essa variável foi encontrado no meio com $\frac{1}{2}$ de sais do MS. Isso demonstra a influência de fatores químicos e físicos sobre a conservação *in vitro* dessas espécies e a importância de serem testados conjuntamente. Na conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. Subsp. *mucugensis* (BRITO, 2009) a interação “agente osmótico x temperatura” também foi importante para os resultados obtidos.

Tabela 5. Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas senescentes (NFS) em função do meio de cultura e da condição de cultivo, na conservação *in vitro*.

Meio de cultura	CPA (cm)	
	Condição de cultivo	
	Sala de conservação	Sala de crescimento
MS	8,17 abA	8,40 aA
1/2 MS	8,72 aA	7,16 bB
1/3 MS	7,32 bA	8,11 abA
NFS		
MS	3,45 aA	4,63 aA
1/2 MS	3,38 aA	2,55 bA
1/3 MS	3,33 aA	3,34 abA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao efeito do tempo de conservação sob os fatores em estudo, a interação “tempo de conservação x condição de cultivo”, foi significativa para o comprimento da parte aérea nas duas condições de cultivo nos dois períodos de conservação, sendo o menor valor observado aos seis meses de conservação *in vitro* nas condições da sala de conservação (6,41 cm) e aos doze meses o menor valor foi observado nas condições da sala de crescimento (8,65). Para o número de folhas senescentes, houve diferença estatística somente nas condições de cultivo no período de 12 meses, sendo que o menor número de folhas senescentes nesse período foi obtido em condição de sala de conservação. Contudo, pode-se observar que entre as duas condições de cultivo o número de folhas senescentes foi menor aos seis meses de conservação (Tabela 6), o que já era esperado, considerando que as condições de cultivo em sala de conservação são indicadas para a conservação *in vitro* por reduzir o metabolismo da planta (SOUZA *et al.*, 2006) e com o aumento do tempo de conservação, sem a manutenção do meio, as folhas das plantas tendem a senescerem.

Tabela 6. Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas senescentes (NFS) em função da condição de cultivo e do tempo de conservação *in vitro*.

Condição de cultivo	CPA (cm)	
	Tempo de conservação	
	6 meses	12 meses
Sala de conservação	6,41 bB	9,71 aA
Sala de crescimento	7,20 aB	8,65 bA
	NFS	
Sala de conservação	1,34 aB	5,40 bA
Sala de crescimento	0,98 aB	6,23 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As figuras 1, 2 e 3 demonstram o crescimento das plantas (CPA) das três espécies de *Aechmea* ao longo dos doze meses de conservação, nas duas condições de cultivo (sala de conservação e sala de crescimento). As plantas mantidas nas condições da sala de crescimento apresentaram maior crescimento até os nove meses de cultivo, quando se registrou uma estagnação do desenvolvimento das mesmas. O contrário pode ser observado com as plantas cultivadas na câmara de conservação, quando a partir dos nove meses, apresentam uma continuidade do crescimento e em índices maiores que os observados na outra condição.

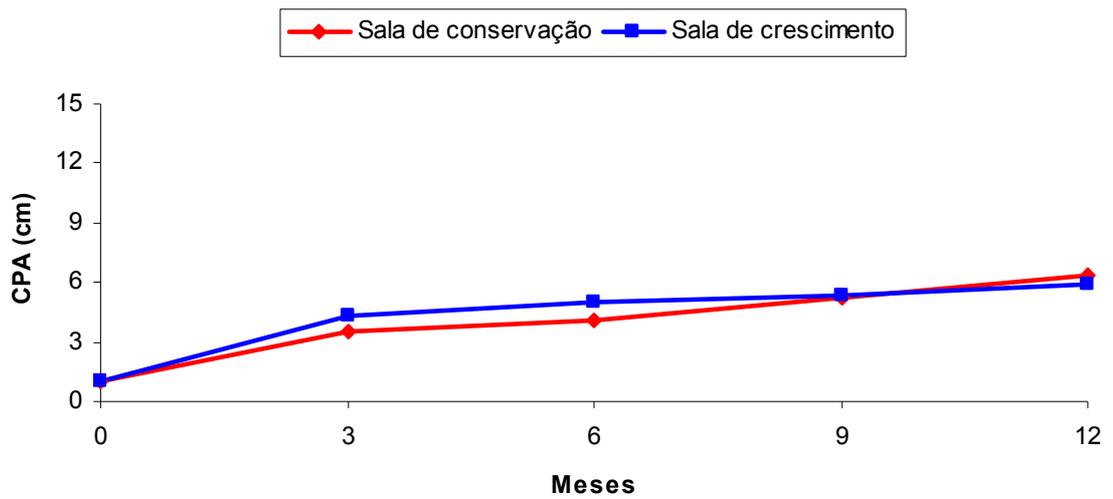


Figura 1. Comprimento da parte aérea de plantas de *A. blanchetiana*, mantidas em sala de conservação e sala de crescimento, ao longo de 12 meses de conservação *in vitro*.

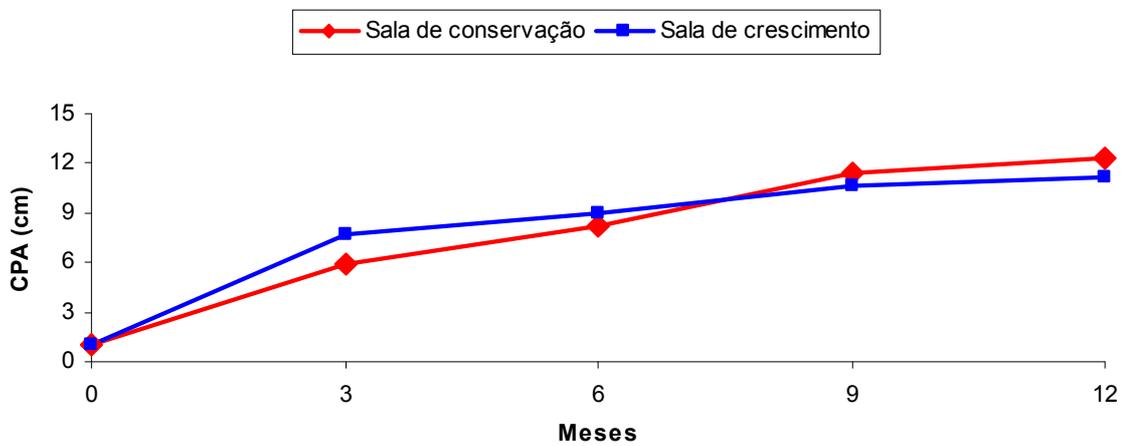


Figura 2. Comprimento da parte aérea de plantas de *A. distichantha*, mantidas em sala de conservação e sala de crescimento, ao longo de 12 meses de conservação *in vitro*.

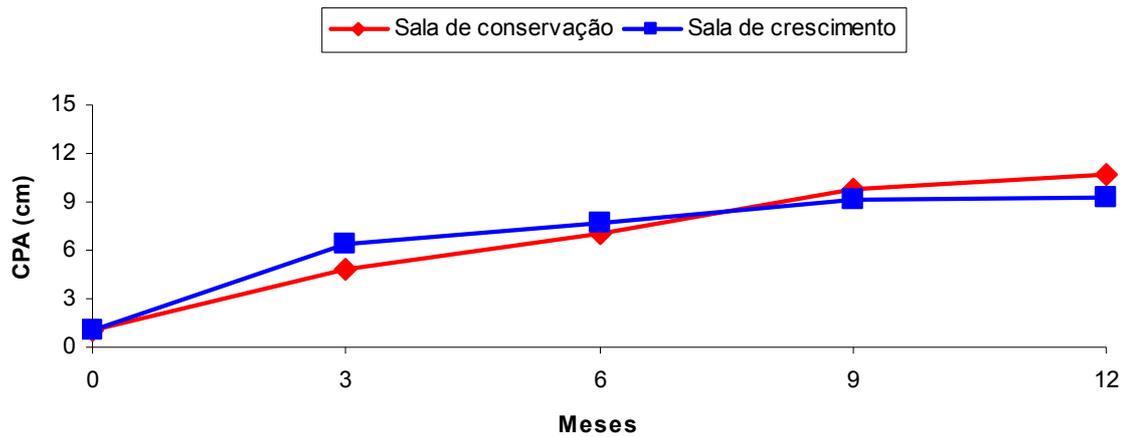


Figura 3 Comprimento da parte aérea de plantas de *A. leptantha*, mantidas em sala de conservação e sala de crescimento, ao longo de 12 meses de conservação *in vitro*.

O crescimento das plantas em sala de conservação, a partir dos nove meses, superando as da sala de crescimento, deveu-se, provavelmente à conjugação de diversos fatores, como temperatura, fotoperíodo e volume do meio de cultura. Vale destacar, que ao final dos nove meses, as plantas cultivadas na sala de crescimento praticamente não tinham mais meio de cultura nos tubos de ensaio. Na Figura 4 é possível observar as diferenças entre as espécies nas duas condições de cultivo e constatar a drástica redução do volume de meio nas plantas cultivadas na sala de crescimento, o que explica o menor valor de comprimento da parte aérea das plantas conservadas nas condições da sala de crescimento aos doze meses (Tabela 6). Além disso, podemos observar nessa figura que existem diferenças marcantes no aspecto das folhas, sendo que as plantas mantidas em sala de conservação apresentam folhas mais espessas e vigorosas, principalmente para as espécies *A. blanchetiana* e *A. leptantha*.

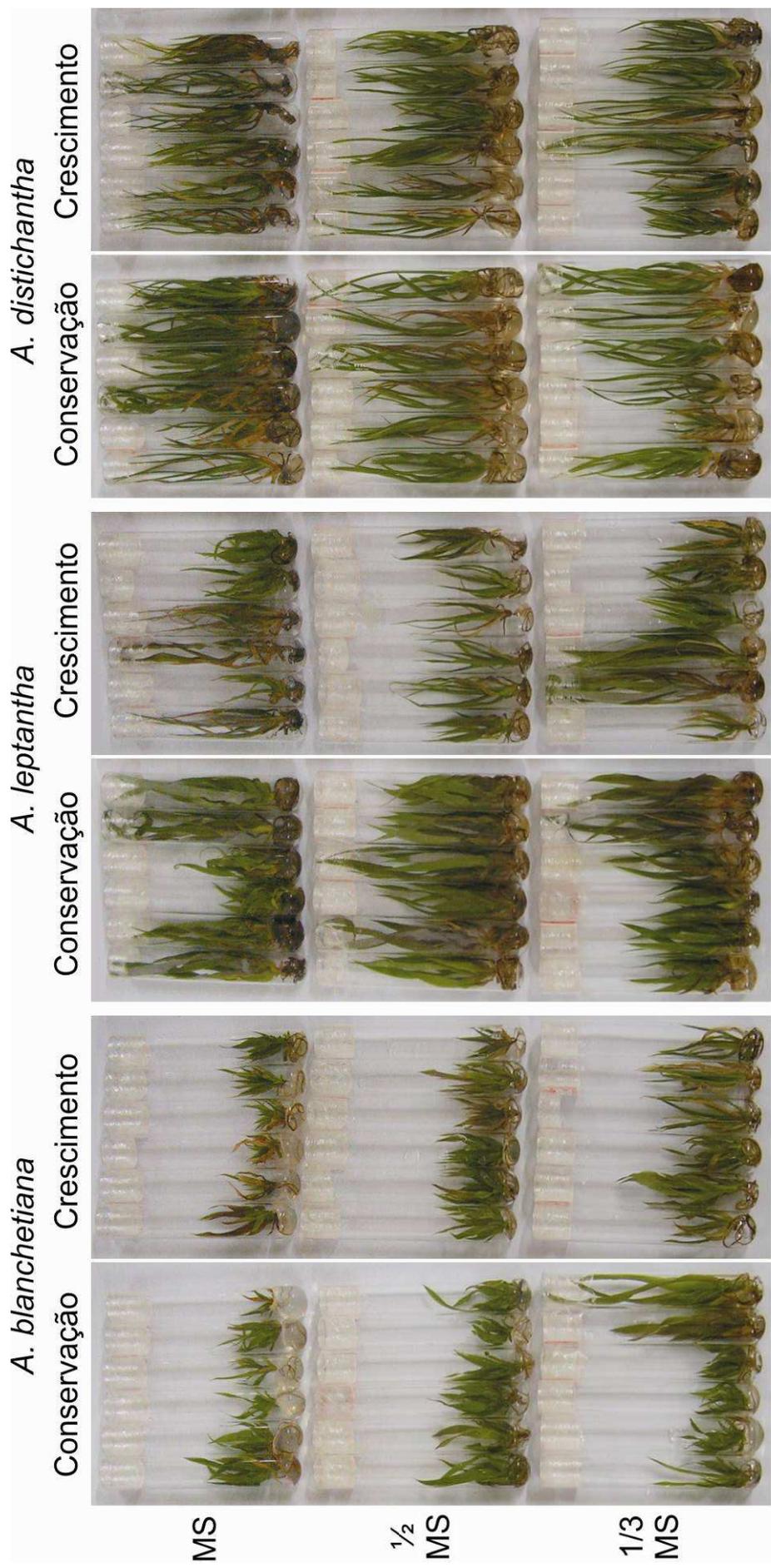


Figura 4. Plantas de três espécies de *Aechmea*, após 12 meses de cultivo em sala de conservação e crescimento.

Essa drástica redução no volume do meio pode estar relacionada, por exemplo, com a maior temperatura de incubação na sala de crescimento, fator considerado importante, para o metabolismo das plantas. Uma das diferenças mais marcantes entre ambas as condições de incubação usadas neste trabalho foi exatamente a temperatura, que na sala de crescimento está em torno de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ enquanto na sala de conservação são quase 5°C a menos. Temperaturas mais elevadas podem provocar um aumento, no metabolismo da planta, fazendo com que a mesma consuma mais meio, levando a um esgotamento do mesmo e afetando o crescimento da planta por falta de nutrição (ISLAM *et al.*, 2005).

Alguns registros na literatura fazem referência à resposta de plantas *in vitro* de abacaxi ao aumento de temperatura, quando aceleram seu crescimento e se desenvolvem mais (ISLAM *et al.*, 2005). Considerando que essa espécie também é uma Bromeliacea, uma analogia nesse comportamento pode ser sugerida. Lemos *et al.* (2002), relatam um aumento significativo no tempo de conservação *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar mantidas sob baixa temperatura (15°C) em combinação com sacarose e reguladores osmóticos, devido, principalmente à redução do metabolismo das mesmas por conta da baixa temperatura.

Nesse trabalho, provavelmente os dois fatores, a temperatura mais elevada e o volume do meio de cultura, foram preponderantes para o maior desenvolvimento das plantas na sala de crescimento até os nove meses e sua redução após esse período. Dessa forma, a quantidade de meio de cultura, é um aspecto que deve ser considerado na estratégia de conservação *in vitro* para essas espécies de bromélias. De qualquer maneira não se pode ignorar o fotoperíodo (que apresenta 4 horas a mais de luz) e a própria densidade de fluxo de fótons, fatores, que provavelmente auxiliaram no aumento do metabolismo dessas plantas. Esse conjunto pode responder pelo maior desenvolvimento das plantas na sala de crescimento e da estagnação do mesmo, quando não havia mais meio de cultura para subsidiar a continuação do crescimento.

Por outro lado, independente dos tratamentos, foi observado maior crescimento geométrico (%) mensal durante os primeiros seis meses, quando comparado com os últimos seis meses de avaliação (Tabela 8). Isto se deve provavelmente ao estabelecimento das plantas, que demandam um crescimento inicial mais acelerado e mais nutriente para a formação de folhas e raízes, o que está dentro dos padrões normais de desenvolvimento de qualquer planta, onde o

crescimento inicial é sempre maior. Observa-se também, de forma geral, que independente dos outros fatores as taxas de crescimento geométrico no último período de avaliação são maiores para as plantas conservadas na condição da sala de conservação, comportamento explicado pela disponibilidade de meio de cultura aos doze meses de conservação nessa condição, contrário a ausência de meio de cultura aos nove meses de conservação na condição da sala de crescimento, cessando o metabolismo e conseqüentemente o crescimento da planta.

Tabela 7: Taxa de crescimento geométrico (%) do comprimento da parte aérea (CPA) de três espécies de *Aechmea*, conservadas *in vitro* em diferentes tratamentos.

Espécie	Meio de cultura	Condição de cultivo	Tratamento	0 a 6 meses	6 a 12 meses
<i>A. blanchetiana</i>	MS		1	36,08	10,48
	1/2 MS		2	43,18	5,48
	1/3 MS		3	35,78	6,13
<i>A. distichantha</i>	MS		4	44,98	5,32
	1/2 MS	Sala de conservação	5	43,76	6,23
	1/3 MS		6	35,90	10,52
<i>A. leptantha</i>	MS		7	25,69	5,47
	1/2 MS		8	27,09	7,53
	1/3 MS		9	26,95	8,99
<i>A. blanchetiana</i>	MS		10	40,17	5,45
	1/2 MS		11	39,95	0,56
	1/3 MS		12	42,23	2,39
<i>A. distichantha</i>	MS		13	46,88	3,79
	1/2 MS	Sala de crescimento	14	42,95	4,04
	1/3 MS		15	42,66	2,77
<i>A. leptantha</i>	MS		16	25,38	5,91
	1/2 MS		17	30,07	1,33
	1/3 MS		18	35,33	1,67

2.4 CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- *A. blanchetiana* apresenta menor crescimento *in vitro* nas condições estudadas, seguida de *A. leptantha* e *A. distichantha*.
- A redução dos sais de MS deve ser considerada na conservação *in vitro* de *A. distichantha*;
- O tempo máximo de conservação *in vitro* na condição da sala de crescimento é de 9 meses;
- A conservação *in vitro* das espécies estudadas em condições de sala de conservação deve ser feita em meio com 1/3 das concentrações de sais do MS por um período de 12 meses

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L.; VEIGA, R. F. de A.; TOMBOLATO, A. C. F.; BARBOSA, W.; CONAGIN, A. Conservação *in vitro* de germoplasma indexado de três cultivares de amarílis (*Hippeastrum* Herb.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 113-120, 2007.

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v.11, p.1081-1089, 2002.

BRITO, A. L. **Micropropagação e conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. Subsp. *mucugensis***. 2009. 116 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana-BA.

BUNN, E. Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, p. 97–102, 2005.

CARNEIRO, L. A. & MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, Viçosa, v.2, n.1, p.12-20, 2004.

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**, Dordrecht, v. 55, p. 79–83, 1999.

DROSTE, A.; SILVA MACHADO, A. da; 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**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

ENGELMANN, F. *In vitro* germplasm conservation. In: DREW, R.A. [ed.]. **Tropical & Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/Embrapa – CNPH. 1998. p. 41- 47.

FLORIDATA. ***Aechmea distichantha***. Disponível em: <http://www.floridata.com/ref/A/aech_dis.cfm>. Acesso em 12 de julho de 2009.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FORZZA, R. C. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, p. 1-49, 2005.

FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; SILVA, S.O. **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Maniot esculenta crantz*) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, EMBRAPA/CMPMF (Circular técnica 74), Cruz das Almas, 2005.

GILMAN, E. F. ***Aechmea distichantha***. Disponível em: <<http://hort.ufl.edu/shrubs/AECDISA.PDF>>. Acesso em 12 de julho de 2009.

HASSAN, N. S. Storage of *in vitro* banana shoot cultures at low temperature or under mineral oil layer. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 2, p. 303-306, 2004.

IBAMA: **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. IN Nº06. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/wp-content/files/IN_06_Lista_Spp_Flora_Ameacada_de_Extincao.pdf>. Acesso em 04 de julho de 2009.

ISLAM, M. T.; DEMBELE, D. P.; KELLER, J. E. R. Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four

mint accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 123–130, 2005.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇÁLVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. Cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

LATA, H.; MORAES, R. M.; BERTONI, B.; PEREIRA, A. M. S. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Heidelberg, v. 46, p. 22–27, 2010.

LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

LEME, E. M. C. Nominal extinction and the taxonomist's responsibility: the example of Bromeliaceae in Brazil. **Taxon**, Utrecht, v. 52, p. 299-302, 2003.

LEME, E. M. C. & MARIGO, L. C. Bromélias na natureza. **Marigo Comunicação Visual**, Rio de Janeiro. 1993. 183 p.

LEMONS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; RAMALHO NETO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

MARTIN, K. P.; PRADEEP, A. K.; Simple strategy for the *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Diocorea spp.*) germplasm. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v.1, n. 3, p. 103-116, 2003.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F. da; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de

espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.59, n.1, p.209-258. 2008.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - BA.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p.30-55, 2001.

RAO, N. K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, Africa, v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.

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

SANTOS, M. T. Micropropagação e viabilidade de regeneração de variedades silvestres de abacaxi conservadas *in vitro*. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - BA.

SARKAR, D.; PANDEY, S. K.; CHANEMOUGASOUNDHARAM, A.; SUD, K. C. The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 221–227, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 846p., 2004.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 4, p. 923-932, 2009.

SIQUEIRA FILHO, J. A. & LEME, E. M. C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste – Biodiversidade, conservação e suas Bromélias**, Rio de Janeiro: Andréa Jakobsson Estúdio, 360 p., 2006.

SOUZA, E. R.; COSTA, M. A. P. C; ROCHA, M. A. C. **Multiplicação e conservação *in vitro* de *Ananas lucidus***. Disponível em: <http://www.ufrb.edu.br/sprb/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=2 -> Acesso em: 20 de fevereiro 2008.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; *In vitro* conservation of pineapple germplasm at Embrapa Cassava and Fruits. **Pineapple News, Honolulu – Hawaii**, n. 11.p.21-22, may, 2004.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; CARDOSO, J. L.; BENJAMIN, D. A. Minimum growth conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 702, p. 41-47, 2006.

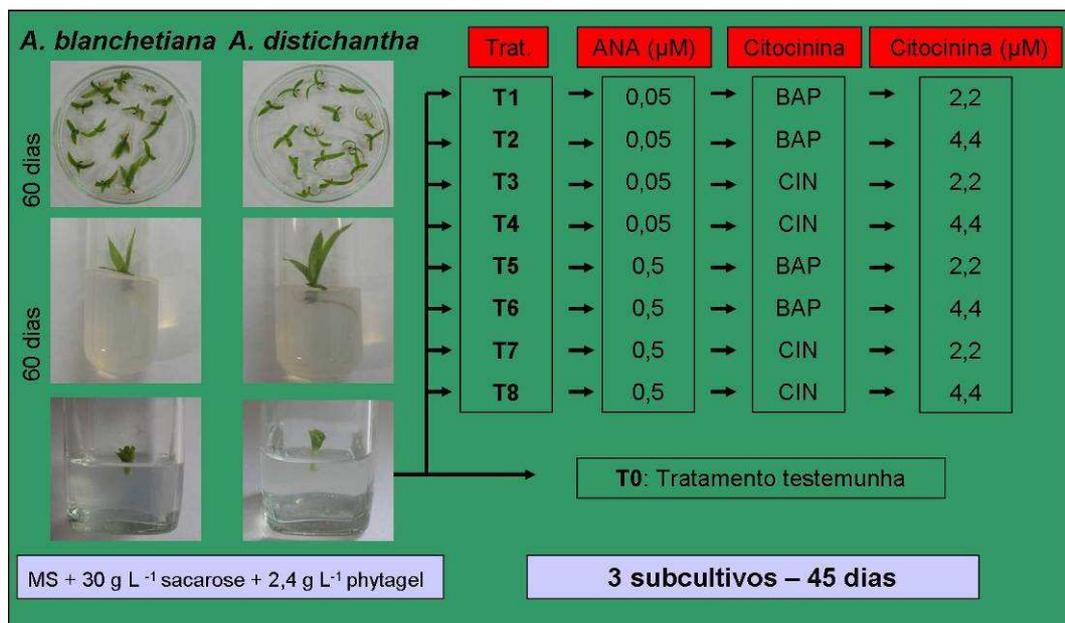
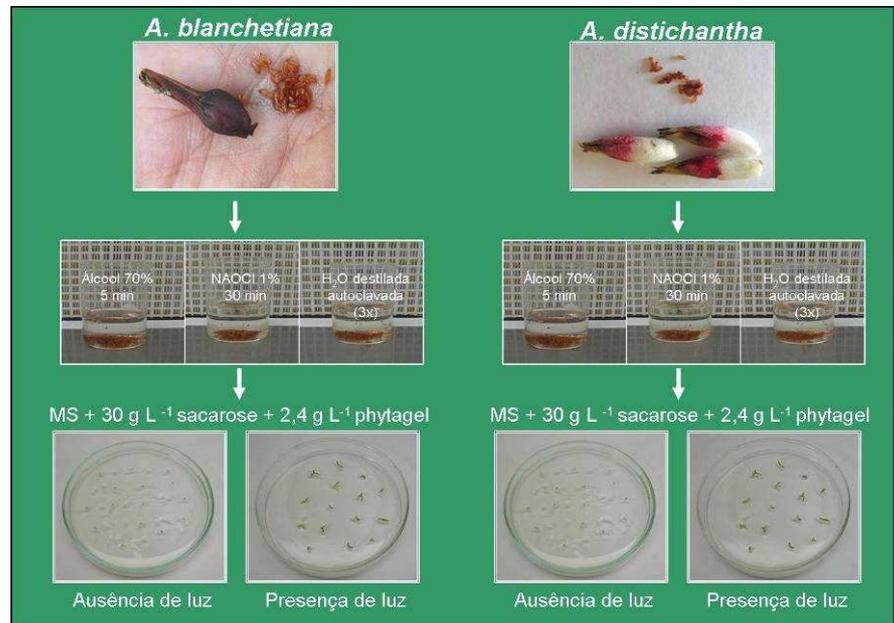
ZORNING, R. K. Micropropagação de bromélias. **Bromélia**, Rio de Janeiro, n.3, p. 3-9, 1996.

CONCLUSÃO GERAL

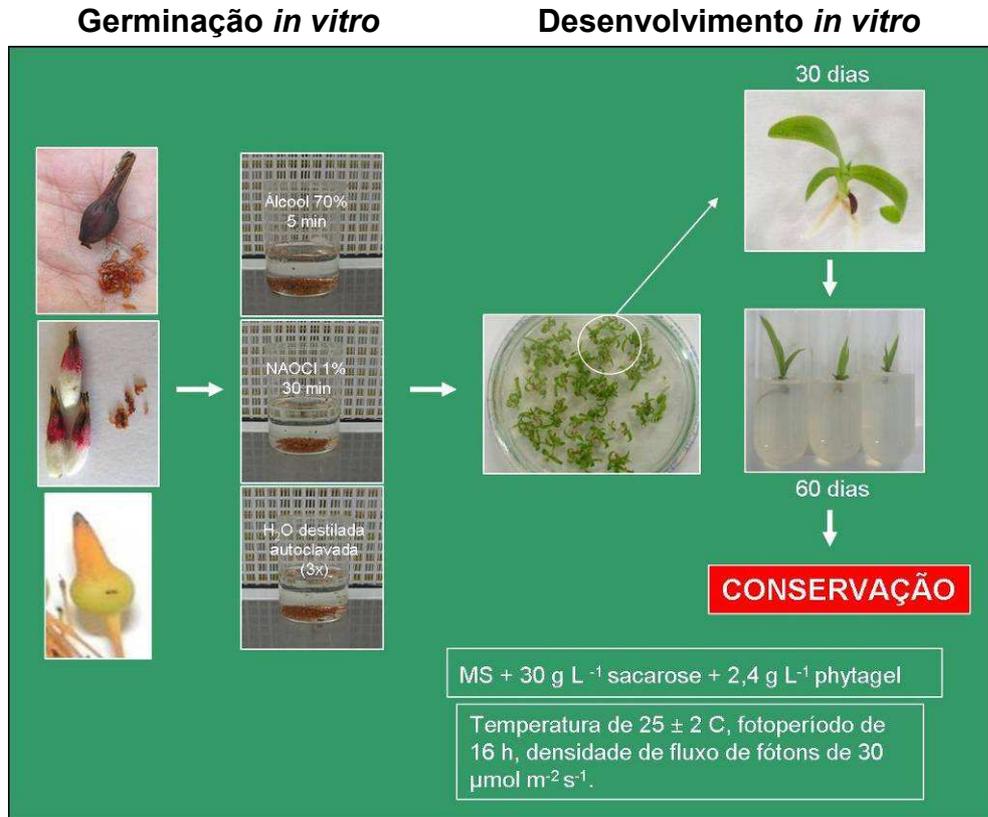
- A germinação *in vitro* de *A. blanchetiana* e *A. distichantha* deve ser realizada em meio MS e cultivada em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas com densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$;
- Na etapa de multiplicação foram observadas diferenças entre as espécies, quando a *A. blanchetiana* apresentou taxas de multiplicação superior as que foram obtidas para *A. distichantha* nas condições estabelecidas nesse trabalho. Ainda assim, para a micropropagação de ambas as espécies se recomenda o meio MS suplementado com $0,5 \mu\text{M ANA} + 2,2 \mu\text{M BAP}$.
- Os melhores resultados em relação à redução do crescimento *in vitro* nas condições estudadas, foram obtidos com *A. blanchetiana*, seguida da *A. leptantha* e da *A. distichantha*. Apesar das diferenças é possível recomendar a conservação *in vitro* em câmara de conservação em meio com 1/3 das concentrações de sais do MS por um período de 12 meses para as três espécies. Por outro lado, para a conservação em condições de sala de crescimento, o período máximo para o primeiro subcultivo é de 9 meses.

ANEXOS

Anexo A. Desenho experimental capítulo 1



Anexo B. Desenho experimental capítulo 2



Conservação *in vitro*

