



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS**  
**VEGETAIS**



**DINAH ISE JIMENEZ GONÇALVES E COSTA PINTO**

**MICROPROPAGAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE VELOZIACEAE DA**  
**CHAPADA DIAMANTINA**

Feira de Santana – BA

2021

**DINAH ISE JIMENEZ GONÇALVES E COSTA PINTO**

**MICROPROPAGAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE VELOZIACEAE DA  
CHAPADA DIAMANTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof. Dra. Alone Lima Brito

Feira de Santana – BA

2021

## Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

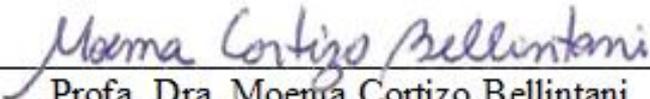
P726m Pinto, Dinah Ise Jimenez Gonçalves e Costa  
Micropropagação de duas espécies de Velloziaceae da Chapada  
Diamantina / Dinah Ise Jimenez Gonçalves e Costa Pinto

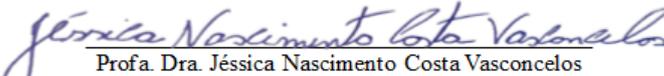
50 p.: il.  
Orientadora: Alone Lima Brito  
Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em recursos Genéticos Vegetais, 2021.

1. Flores rupestres – *Velloziaceae* 2. Florística – Chapada  
Diamantina (BA). 3. Florística – Propagação *in vitro*. I. Brito, Alone  
Lima, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 581.145.1 (814.22)

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Jéssica Nascimento Costa Vasconcelos



---

Profa. Dra. Orientadora Alone Lima Brito

Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana - BA

2021

“Viver é uma eterna readaptação.”

Neil Barreto

À mainha (Ana Lúcia), dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Minha vida e trajetória é uma história escrita por DEUS, a graça dEle me alcança todos os dias, e a finalização do mestrado é mais uma confirmação do seu infinito cuidado e misericórdia em minha vida. “PorqueEle, por meio dEle, para Ele são todas as coisas.” Jesus é a minha força e segurança!

Deus demonstra seu cuidado por meio de pessoas, e esta conquista não seria possível sem o auxílio e suporte de pessoas queridas e por isso, agradeço...

À minha mãe, minha maior incentivadora da realização de sonhos e objetivos. Abraça comigo todos os meus desejos e até aqui não foi diferente. Obrigada por todo amor, suporte e cuidado. Essa vitória é nossa, mainha. Te amo, mama!

À minha avó, meu maior exemplo de fé, mansidão e tranqüilidade. Agradeço infinitamente as orações, com certeza elas me fizeram chegar aqui.

Aos meus queridos irmãos, Bárbara Jimenez e Mayo Mateus, pelo amor infinito, felicidade compartilhada e cuidado.

Ao meu sobrinho amado, Oscar Bernardo, pelos sorrisos, carinho e amor.

Aos meus tios e tias pelo apoio, compreensão e cuidado.

Meus primos e primas pela felicidade a mim proporcionada, pelo apoio, por torcer sinceramente por mim, como irmãos. Aos pequeninos... sou infinitamente grata, pois, vocês, mesmo sem ainda saberem, me alegram todos os dias e me fazem ter esperança por dias melhores. Amo vocês, meus bebês! Sou muito grata pela família maravilhosa e cúmplice que Deus me deu oportunidade de ter.

Ao meu noivo e melhor amigo, Felipe Tavares, por sempre acreditar em mim, pelo carinho, respeito, cumplicidade e cuidado. Certamente esse período teria sido muito mais difícil sem você. Te amo muito! Obrigada por me ajudar e não medir esforços para dar força em tudo o que eu faço.

À família Tavares (que também é minha família) pelo acolhimento, alegria e amor a mim dispensado. Vocês foram peças fundamentais para que esse sonho se tornasse realidade.

À minha querida orientadora e conselheira, Alone Lima Brito. Profissional de excelência, que faz jus a sua profissão. Exemplo de mulher, esposa, mãe a ser seguido. Esses anos foram muito mais leves porque tive a senhora como ORIENTADORA. Nos momentos de desânimo, ansiedade e agonia, suas palavras vieram como direção e ânimo para minha alma. Obrigada por sempre acreditar em mim, até quando eu mesma desacreditei.

À equipe maravilhosa do LCTV pelo profissionalismo, leveza, simplicidade e amizade. Obrigada a todos pelas risadas, gentileza e trocas de conhecimento. Agradeço de maneira especial à Bárbara por ceder gentilmente o material vegetal para este trabalho, por todo suporte técnico quando precisei, pelas palavras de ânimo, força e a Daniela por me trazer à realidade em muitos momentos, pelas conversas e encontro de almas.

Agradeço as minhas companheiras de casa, Alana e Mariana por, como irmãs, me acolherem todos os dias, torcerem por mim e vibrarem a cada conquista. Vocês foram essenciais nesse período, pois, em meio ao caos, Deus me deu um LAR fora de casa. Levarei essa experiência gostosa para o resto da minha existência.

Aos meus colegas de turma, Jamile e Vitor, pela parceria e cumplicidade. Jamile é meu outro eu acadêmico, sentimos muito igual e enxergamos muito semelhante as coisas. Deus nos fez vencer a ansiedade, medo e timidez, amiga. EBENÉZER!

Agradeço aos meus colegas da pós-graduação, especialmente à turma 2020.1 por acolherem tão bem a mim nas diversas disciplinas que cursamos juntos. Vocês são maravilhosos!

À minha amiga, Josandra, pelo apoio, compreensão e torcida. Pela disposição em ouvir, trocar experiências de vida e ensinamentos acadêmicos. A nossa frase de vida é: “tudo passa!”, e realmente passou.

Ao meu psicólogo, Ricardo Gomes, pelo apoio emocional, pelas instruções e torcida. Por sempre me mostrar a melhor parte de tudo. Por sempre dizer: “Você vai colher frutos bons disso!”. Obrigada!

Agradeço aos professores que fizeram parte da minha formação, aos funcionários do Horto Florestal e a Alberto pela prestatividade e leveza.

À banca, por aceitar o nosso convite e contribuir para a concretização desse trabalho.

Aos amigos, irmãos em Cristo e colegas pelo apoio, torcida e carinho. Amos todos vocês! O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001).

Só consigo agradecer pela graça de Deus e pelo maior presente que ele me dá em todas as fases da minha vida: as pessoas que tenho oportunidade de conviver.

## RESUMO

Velloziaceae é uma das principais famílias da composição florística dos campos rupestres da Chapada Diamantina e possui espécies com significativo potencial ornamental e resistência a mudanças climáticas. As espécies *Vellozia seubertiana* e *Vellozia pyrantha* se destacam pela beleza das suas flores e carecem de estudos que garantam a sua propagação e conservação. Este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos de micropropagação das espécies *V. seubertiana* e *V. pyrantha*. Para o estabelecimento *in vitro* as sementes das duas espécies foram desinfestadas e inoculadas em meio MS com metade das concentrações salinas (MS ½) contendo 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado a parte aérea das plantas germinadas *in vitro* foram utilizadas para a indução de brotos em meio MS ½ suplementado com BAP (0,00; 4,44; 8,88 e 17,76 µM) e ANA (0,00 e 2,22 µM). Para *V. seubertiana* testou-se também a influência da consistência do meio de cultura (sólido e líquido) na etapa de multiplicação. Brotos de *V. seubertiana* foram inoculados em meio MS ½ contendo carvão ativado (0,0 e 1,0 g L<sup>-1</sup>) e AIB (0,00 e 2,22 µM) para enraizamento. Microplantas enraizadas foram aclimatizada sem casa de vegetação. Obteve-se, via organogênese direta, uma média de 5,7 brotos de *V. seubertiana* em meio contendo 8,75 µM de BAP e 2,22 µM de ANA e 5,5 brotos por explante para a espécie *V. pyrantha* em meio com 4,44 µM de BAP. O meio sólido foi mais eficiente para a multiplicação de *V. seubertiana*. Na fase de enraizamento de *V. seubertiana*, a presença do carvão ativado proporcionou maior crescimento da parte aérea e da raiz; e as plantas aclimatizadas atingiram 75% de sobrevivência após 60 dias da transferência para a condição *ex vitro*. Conclui-se que a micropropagação é uma técnica promissora para as espécies *V. seubertiana* e a *V. pyrantha*.

**Palavras-chave:** Campo rupestre. Propagação *in vitro*. Regulador vegetal.

## ABSTRACT

*Velloziaceae* is one of the main families of the floristic composition of the rupestrian fields of Chapada Diamantina and has species with significant ornamental potential and resistance to climate change. The species *Vellozia seubertiana* and *Vellozia pyrantha* stand out for the beauty of the flowers and lack studies to guarantee their propagation and conservation. This work had as objective to establish protocols of micropropagation of the species *V. seubertiana* and *V. pyrantha*. For establishment *in vitro* the seeds of the two species were disinfected and inoculated in MS medium with half the saline concentrations and activated charcoal 1 g L<sup>-1</sup>. Whole germinated plants *in vitro* were used for the induction of shoots in MS ½ medium supplemented with BAP (0.00; 4.44; 8.88 and 17.76 µM) and ANA (0.00 and 2.22 µM). For *V. seubertiana* the influence of the consistency of the cultivation medium (solid and liquid) in the multiplication step was tested. Shoots of *V. seubertiana* were inoculated in MS ½ medium containing activated charcoal (0.0 and 1.0 g L<sup>-1</sup>) and IBA (0.00 and 2.22 µM) for rooting. Rooted Microplantas had been acclimatized in vegetation house. It was obtained, via direct organogenesis, an average of 5.7 sprouts of *V. seubertiana* in a medium containing 8.75 µM of BAP and 2.22 µM of ANA and 5.5 sprouts per explant for the species *V. pyrantha* in medium with 4.44 µM of BAP. The solid medium was more efficient for the multiplication of *V. seubertiana*. In the rooting phase of *V. seubertiana*, the presence of activated carbon provided greater growth of the aerial part and root. *ex vitro*. It is concluded that micropropagation is a promising technique for the species *V. seubertiana* and *V. pyrantha*.

**Key words:** Campo rupestre. *In vitro* propagation. Vegetable regulator.

## INTRODUÇÃO

A Chapada Diamantina é formada por diversos tipos de vegetação, incluindo floresta, caatinga, cerrado e campo rupestre, que é a mais típica da região onde há o predomínio de afloramentos rochosos ligados a uma fisionomia herbáceo-arbustiva (CONCEIÇÃO et al., 2005).

As espécies vegetais dos campos rupestres proporcionam uma beleza ímpar a essa ecorregião. Pelo elevado potencial para o mercado de plantas ornamentais e outros usos já atribuídos, muitas dessas espécies são extraídas de forma inconsciente, trazendo riscos aos recursos genéticos vegetais desse local.

Além da coleta indiscriminada, os incêndios florestais frequentes são um ponto de discussão quanto aos riscos causados à vegetação de uma forma geral e quanto aos benefícios associados a algumas espécies de potencial ornamental típicas do território, como as velózias, por exemplo.

Velloziaceae faz parte do grupo de famílias vegetais diagnósticas da vegetação rupestre (COSTA; SANO; TROVO, 2008), sendo uma das famílias mais interessantes da América do Sul, com a maioria das espécies adaptadas a mudanças climáticas adversas e ao crescimento sobre rochas (AYENSU, 1973).

Nos campos rupestres da Chapada, espécies dessa família possuem grau de endemismo considerável (NEVES, 2009), e ao florescerem, garantem uma exuberância sem igual ao local (CONCEIÇÃO et al., 2005), razão do importante papel para a região. Dentre estas estão às espécies *Vellozia seubertiana* Goethart & Henrard. E *Vellozia pyrantha* A. A. Conc. (basinomio=*Vellozia sincorana*), conhecida popularmente como candombá, que têm como característica em comum a exuberância de suas flores lilases e roxas (NEVES, 2009), além disso, possuem caules cobertos por bainhas foliares que asseguram proteção quando em contato com o fogo rápido (ALVES; SILVA, 2011).

A *V. seubertiana* é uma espécie endêmica do Brasil (MELLO-SILVA, 2015) com ocorrência na Chapada Diamantina. Já o candombá ocorre restritamente na região da Chapada (AYENSU; SMITH, 1976). Essas espécies possuem hábitos de crescimento herbáceo e ocorrem sobre rochas, sendo a *V. seubertiana* ocorrente também em solos arenosos (NEVES, 2009). São recursos potenciais ao uso como plantas ornamentais, entretanto, para que isso ocorra de forma racional, são imprescindíveis estudos que

auxiliem o manejo de suas populações naturais bem como técnicas que possibilitem a conservação *ex situ* e a produção de mudas de qualidade.

Dentre as estratégias utilizadas para a produção de mudas, a cultura de tecidos vegetais se destaca como excelente alternativa para o atendimento ao seguimento agrícola de plantas ornamentais, com o fornecimento de plantas saudáveis; assim como para a conservação *ex situ*.

A micropropagação de plantas é uma forma de reprodução assexuada iniciada por pequenos fragmentos, denominados explantes (DEBERGH; GEORGE, 2008). É a aplicação mais comum da cultura de tecido e proporciona a produção de plantas com características idênticas às matrizes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), constituindo-se numa excelente alternativa para atender ao mercado ornamental.

Essa técnica possibilita a produção de elevado número de mudas em um pequeno espaço (DEBERGH; GEORGE, 2008), e é constituída de quatro etapas: inicialmente é feita a seleção, desinfestação e estabelecimento do explante *in vitro* em meio de cultura, seguido da multiplicação, enraizamento e, por fim, a aclimatização de plantas, em que ocorre a passagem do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para a condução da micropropagação é necessário um meio nutritivo que supra as necessidades das culturas *in vitro*. Esses meios são compostos basicamente por água, macro e micronutrientes, vitaminas e carboidratos, podendo ser preparados em estado sólido ou líquido, que é de maneira geral, mais barato e prático, mas precisam de alguma técnica que possibilite a oxigenação da cultura *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998), como o uso de suporte para a planta, por exemplo.

Na literatura há poucos relatos de pesquisas que visem à propagação *in vitro* de espécies do gênero *Vellozia*, sendo encontrados um estudo para *V. flavicans* Mart. ex Schult f. (FREITAS NETO, 2009) e dois para a espécie *V. pyrantha* A. A. Conc (BORGES, 2015; BORGES et al., 2020). No entanto, pesquisas realizadas com outras espécies ornamentais ocorrentes na Chapada Diamantina demonstraram a viabilidade da cultura de tecidos para a micropropagação de bromélias (BELITTANI et al., 2007a; BELITTANI et al., 2007b; LIMA et al., 2012; LIMA; LIMA-BRITO; SANTANA, 2020;), sempre-vivas (ALBUQUERQUE et al., 2016; CARMO; MOURA, LIMA-BRITO, 2020; CARMO; MOURA, LIMA-BRITO, 2021; LIMA-BRITO et al., 2011; LIMA-BRITO et al. 2016; LIMA; LIMA-BRITO; SANTANA, 2021; PAIXÃO-SANTOS, 2003; PAIXÃO-SANTOS, 2006; PAIXÃO-SANTOS et al., 2008;), cactáceas

(RESENDE; LIMA-BRITO; SANTANA, 2010; RESENDE et al., 2021; TORRES-SILVA et al., 2021) e orquídeas (SHERLOCK, 2009; VIANA, 2013).

Considerando a importância e a peculiaridade dos recursos vegetais dos campos rupestres da Chapada Diamantina, a eficiência da aplicação da micropropagação em atender o comércio de plantas ornamentais, além da raridade de estudos de propagação com espécies de velózias, o objetivo desse estudo foi estabelecer protocolos de micropropagação das espécies *V. seubertiana* e *V. pyrantha*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Recursos genéticos vegetais da Chapada Diamantina, Bahia

A Chapada Diamantina ocupa uma extensão territorial de 50.610 km, engloba 58 municípios e fica localizada na região central do estado da Bahia; é composta por uma ampla diversidade de vegetação, incluindo floresta, caatinga, cerrado e campo rupestre (ROCHA et al., 2005). O campo rupestre é a vegetação mais típica (CONCEIÇÃO et al., 2005), com grande diversidade de espécies que merecem atenção, pelas suas peculiaridades morfofisiológicas e, principalmente, pelos usos conhecidos ou potenciais já atribuídos às plantas que compõe essa vegetação, o que torna prioritário o estudo destes recursos genéticos vegetais, tendo em vista a sua conservação *in situ* e *ex situ*.

As plantas do campo rupestre possuem elevada capacidade de firmamento aos substratos dispostos sobre as rochas e são altamente tolerantes ao estresse hídrico (RAPINI et al., 2008). São ocorrentes neste tipo de vegetação espécies das famílias Poaceae, Velloziaceae, Gentianaceae, Orchidaceae, Cyperaceae, Eriocaulaceae, Xyridaceae, Burmanniaceae, Droseraceae, Lentibulariaceae, Ericaceae, Amaryllidaceae, Bromeliaceae, Melastomataceae, Cactaceae, Rubiaceae, Compositae, Euphorbiaceae, Gutiferae, Malpighiaceae e Fabaceae, totalizando 21 famílias (RAPINI et al., 2008). Algumas dessas famílias são indicadoras da vegetação rupestre: Eriocaulaceae, a mais significativa, Xyridaceae, Poaceae, Cyperaceae e Velloziaceae (COSTA; SANO; TROVO, 2008). Além disso, é comum a ocorrência de representantes vegetais do cerrado e das restingas nos campos rupestres por conta das similaridades edafoclimáticas entre esses tipos de vegetação (RAPINI et al., 2008).

Tamanha diversidade foi apresentada em um inventário elaborado pela Associação de Plantas do Nordeste em parceria com a Universidade Estadual de Feira de Santana e o Departamento de Vertebrados - Mastozoologia do Museu Nacional da Universidade do Rio de Janeiro, publicado em 2005, que registrou a presença de 441 espécies vegetais nos campos rupestres da Chapada Diamantina com grande maioria considerada espécie rara, sendo a área total de estudo de 35.392,9 Km<sup>2</sup> (MMA, 2006).

Outra questão importante a respeito dessa vegetação é a sua alta taxa de endemismo. De acordo com Veloso et al. (2002), alguns gêneros ou espécies são endêmicos de localidades específicas desse território, como: *Rayleya* (Sterculiaceae) que contém uma espécie presente apenas em Andaraí; *Mysanthus* (Fabaceae), gênero com uma espécie da parte sul da Chapada; *Heteranthia* (Scrophulariaceae) com uma espécie

de áreas brejosas do leste da Chapada; *Holoregmia* (Martyniaceae) com uma espécie ocorrendo de Rio de Contas até Anajé.

Existem muitas espécies endêmicas da região que são conhecidas e utilizadas pelas comunidades, especialmente pela sua importância ornamental, dentre as quais estão a bromélia *Sincoreamucugensis* (Wand. & A.A. Conc.) LOUZADA & WAND (basinômio = *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição) e a sempre-viva *Comanthera mucugensis* subsp. *mucugensis* (basinômio = *Syngonanthus mucugensis* Giulietti), endêmicas do município de Mucugê (ALMEIDA et al., 2006; LOUZADA; WANDERLEY, 2010), e *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo, uma cactácea endêmica do município Morro do Chapéu (TAYLOR; ZAPPI, 2004).

### **2.1.1 Danos causados à vegetação em decorrência de atividades antrópicas**

A ecorregião Chapada Diamantina tem sofrido no decorrer dos anos com os impactos de atividades antrópicas que causam a degradação dos recursos naturais, incluindo o extrativismo de plantas ornamentais (ROCHA et al., 2005), queimadas constantes, garimpo, expansão da agropecuária (COSTA et al., 2002) e turismo (NEVES; CONCEIÇÃO, 2007).

Espécies ornamentais ocorrentes nos campos rupestres da Chapada são muito atraídas ao extrativismo predatório e já eram coletadas por moradores da região e comercializadas para obtenção de renda antes mesmo da década de 70, conforme relatado por Giulietti et al. (1988); sendo as espécies mais exploradas as sempre-vivas, os cactos, as orquídeas (ROCHA et al., 2005) e as bromélias (LIMA et al., 2012).

No estado da Bahia, a Chapada é uma das regiões que mais enfrenta incêndios florestais (NEVES; CONCEIÇÃO, 2010), em sua maioria, causados por pecuaristas, coletores de plantas ornamentais (por acreditarem que no ano seguinte à queimada os indivíduos brotam com mais vigor), catadores de lenha, turistas inconscientes, agricultores que utilizam o fogo de maneira descuidada, além da ação de pessoas piromaníacas (MMA; ICMBio, 2007).

Os relâmpagos também podem causar incêndio nessa região, mas as ocorrências por esta causa natural não ultrapassam 1% do total de registros (MMA; ICMBio, 2007). Outra problemática associada aos incêndios é que, para chegar até as áreas de ocorrência, brigadistas utilizam técnicas de construção de aceiros, que são corredores formados pela

retirada de vegetação (PNCD, 2009), o que causa impacto negativo nas populações vegetais.

Apesar de autores afirmarem que o fogo é um dos fatores mais importantes na dinâmica da vegetação rupestre, dando destaque para espécies do gênero *Vellozia* (Velloziaceae) (CONCEIÇÃO, 2018; NEVES; CONCEIÇÃO, 2009; NEVES; CONCEIÇÃO, 2010), o fogo que não ocorre de forma natural não deve ser considerado como um fator positivo para a vegetação (MMA; ICMBio, 2007).

As informações aqui relatadas evidenciam a necessidade de pesquisas que estabeleçam medidas e técnicas de conservação para a vegetação da Chapada Diamantina, especialmente com as espécies de Velloziaceae, família pouco estudada.

## 2.2 Velloziaceae

A família Velloziaceae, considerada uma das famílias mais curiosas que ocorrem na América do Sul e na África (AYENSU, 1973), é composta por espécies de plantas de costume solitário (MELLO-SILVA, 2005), perenes, de médio a baixo porte, caules fibrosos e lenhosos e flores solitárias (SMITH; AYENSU, 1976).

A maioria das espécies dessa família tem a capacidade de crescer sobre rochas e são adaptadas a condições climáticas extremas e variáveis (AYENSU, 1973). Possuem caules encobertos por bainhas foliares que protegem essas plantas quando em contato com o fogo (ALVES; SILVA, 2011), característica importante para espécies que ocorrem em regiões nas quais incêndios são recorrentes.

A família Velloziaceae é constituída por aproximadamente 260 espécies que estão distribuídas entre cinco gêneros sendo o de maior relevância o gênero *Vellozia* Vand., com cerca de 121 espécies, com grande parte ocorrendo na região central do Brasil, especialmente na Cadeia do Espinhaço (MELLO-SILVA, 2018). Dentre as espécies deste gênero ocorrentes na Chapada Diamantina estão a *Vellozia pyrantha* AA Conc. E a *Vellozia seubertiana* Goethart & Henrard.

A *Vellozia pyrantha* (basinomio=*Velloziasincorana*) (Fig. 1a) conhecida popularmente como candombá e “espécie do fogo” é uma espécie endêmica dos campos rupestres na região norte da Chapada (AYENSU; SMITH, 1976). Caracteriza-se por plantas que variam de 1 a 4 metros de altura, com lâminas foliares de até 45 cm de

comprimento e 20 mm de largura (SMITH, AYESUN, 1976) e flores de cor lilás (NEVES, 2009).

Diversos trabalhos científicos já concluíram a dependência do fogo no estímulo à reprodução dessa espécie (CONCEIÇÃO; ORR, 2012). As lascas do caule do candombá são utilizadas na medicina popular no tratamento de gastrites, a resina presente nas raízes pode ser utilizada para fazer incenso e os caules inteiros são utilizados como tochas para iniciar fogo (ALMEIDA, 2006). Essa planta e partes dela são comercializadas em feiras na região da Chapada (ALMEIDA, 2006), o que gera risco às populações naturais da espécie.

A *Vellozia seubertiana* (Fig. 1b) é uma espécie presente nos campos rupestres da Chapada e possui indícios de floração impulsionada pelo fogo (NEVES, 2009), mas este não é um fator essencial para que o ciclo fenológico aconteça (NEVES, 2009). As flores de coloração roxa aparecem geralmente na estação chuvosa (NEVES, 2009).



**Figura 1:** *Vellozia pyrantha* (A) e *Vellozia seubertiana* (B) em seu habitat natural, na Chapada Diamantina, Brasil. Fonte A: Bárbara Borges, 2020; B: Autora, 2019.

Essas duas espécies possuem elevado potencial ornamental pela beleza das suas flores, arquitetura das folhas e rusticidade. Para que adentrem ao mercado de plantas ornamentais são necessários estudos que viabilizem a propagação da espécie e a manutenção das populações naturais.

Apesar do potencial que essas espécies possuem, ainda não existem trabalhos de propagação com *V. seubertiana* e são relatados apenas dois estudos para a espécie *V. pyrantha* (BORGES, 2015; BORGES et al., 2020), ambos utilizando técnica de cultura de tecidos vegetais.

### 2.3 Cultura de tecidos vegetais: micropropagação de plantas

A cultura de tecidos vegetais compreende técnicas que possibilitam o cultivo de órgãos, tecidos e células separados da planta matriz em meios nutritivos feitos em laboratório (GEORGE, 2008). Dentre as técnicas possíveis deste seguimento da biotecnologia, a micropropagação, propagação *in vitro* ou clonagem de plantas, é a aplicação de maior relevância (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação é uma técnica na qual as características da planta matriz são mantidas; isso ocorre porque durante as divisões mitóticas os genes são copiados (DEBERGH; GEORGE, 2008). Esta técnica de propagação é realizada em ambiente asséptico, que evita contaminação, requer um espaço relativamente pequeno para manter as culturas, e as microplantas podem ser produzidas em qualquer época do ano independentemente de fatores ambientais que poderiam ser limitantes (DEBERGH; GEORGE, 2008).

A produção de uma muda micropropagada compreende etapas a serem seguidas, podendo existir variações a depender da espécie a ser trabalhada. Murashige (1974) determinou as seguintes fases como essenciais à propagação *in vitro*:

Estágio I: refere-se ao estabelecimento da cultura *in vitro*. O autor destaca a importância da assepsia para eliminar qualquer possível fonte de contaminação, pois o cultivo asséptico é um dos principais princípios da cultura de tecidos.

Estágio II: trata-se da multiplicação *in vitro*, fase em que tecidos vegetais sofrem transformações até desenvolverem uma nova planta.

Estágio III: é caracterizado pela preparação das microplantas para transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, ou seja, da condição heterotrófica para autotrófica. Nesta fase é feito o enraizamento de plantas e o alongamento a fim de conferir às mudas tolerância ao estresse hídrico no ambiente externo.

A capacidade regenerativa e de crescimento *in vitro* está diretamente relacionada à genética e a fisiologia da planta mãe, entretanto, o êxito na aplicação da técnica é determinado por inúmeras variáveis (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para o cultivo *in vitro* são utilizados meios de cultura que fornecem aos tecidos vegetais substâncias necessárias ao crescimento e desenvolvimento vegetal (CALDAS; FERREIRA; HARIDASAN, 1998). A composição dos meios é baseada nas necessidades essenciais de nutrientes exigidos pelas plantas em ambiente natural, pois, embora alguns sistemas do vegetal estejam estagnados, pela insuficiência de alguns fatores presentes nas

condições de incubação, o metabolismo e as vias bioquímicas são mantidos (CALDAS; FERREIRA; HARIDASAN, 1998).

Os meios são compostos por água (componente presente em maior proporção), nutrientes (macronutrientes e micronutrientes), carboidratos (necessário, pois o ambiente do cultivo *in vitro* não apresenta condições para a fotossíntese), vitaminas e outros aditivos, incluindo reguladores vegetais que podem ser incorporados ao meio, a depender das necessidades de cada espécie e dos objetivos do cultivo (CALDAS; FERREIRA; HARIDASAN, 1998).

O estado físico do meio de cultura é um ponto importante durante o cultivo *in vitro*. De maneira convencional, utiliza-se os meios semissólidos obtidos pela adição de agentes gelificantes durante o preparo (GEORGE, 2008). O ágar, polissacarídeo extraído de algas, é o agente gelificante mais utilizado no cultivo *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998), isso porque essa substância não reage significativamente com outros compostos do meio, em água forma géis que derretem a 100°C e se gelificam a mais ou menos 45°C, além disso, esses géis não são consumidos por enzimas vegetais (GEORGE, 2008). No entanto, o ágar contribui com o encarecimento do processo de propagação *in vitro* que é uma tecnologia de uso limitado pelo alto custo de ferramentas e substâncias utilizadas (RIBEIRO; TEIXEIRA-PINTO; TEXEIXA, 2013).

Alguns autores têm empregado o meio líquido na tentativa de otimizar a multiplicação *in vitro* (COSTA, et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2013; COSTA et al., 2016), pois, além de reduzir os custos, a utilização de meio nesse estado físico proporciona uma maior área de contato do material vegetal com o meio de cultura, o que potencializa o desenvolvimento do explante (CALDAS, HARIDASAN, FERREIRA, 1998).

Espécies cultivadas em meio líquido, podem apresentar problemas relacionados à falta de oxigenação e hiperidricidade, que atrasam ou mesmo inviabilizam o desenvolvimento (GEORGE, 2008). Essas limitações são solucionadas, por exemplo, com o uso de suportes que possibilitam a aeração da cultura *in vitro* (GEORGE, 2008). Dentre as alternativas de suportes utilizados, a ponte de papel filtro é citada na bibliografia (BARBOZA et al., 2009; MENGARDA et al., 2009).

A adição de reguladores vegetais ao meio é determinante no crescimento e desenvolvimento na maioria das culturas *in vitro*, principalmente as auxinas e citocininas, classes mais utilizadas (CALDAS; FERREIRA; HARIDASAN 1998). De acordo com Kerbauy (2004), essas classes de hormônios atuam em pontos específicos da divisão

celular e conferem a célula capacidade de progredir no ciclo. As auxinas e citocininas combinadas agem direcionando a morfogênese e promovem o crescimento de órgãos, calos e suspensões celulares (GEORGE, 2008).

O processo de multiplicação *in vitro* pode ocorrer através das vias organogênica ou embriogênica, ambas de forma direta ou indireta, na qual o explante passa por uma fase intermediária de calos (amaranhado celular). De maneira geral, pelo método indireto, as microplantas obtidas, possuem maior possibilidade de serem geneticamente diferentes (GEORGE, 2008), por conta da intensa divisão celular antes da formação de brotos ou embriões.

A organogênese baseia-se na formação de gemas a partir de tecidos potenciais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A embriogênese somática é o processo de desenvolvimento de embriões estruturalmente semelhantes aos encontrados em sementes, com dois polos (raiz e parte aérea) que originarão uma planta inteira (DEBERGH; GEORGE, 2008). Um ponto a ser observado nos materiais vindos de organogênese é a presença de apenas um polo e a existência de um sistema vascular que faz ligação com o explante inicial, essas características são opostas quando ocorre a formação de embriões somáticos, sendo fundamental a distinção de materiais de origem organogênica e embriogênica nos estudos realizados *in vitro* (GUERRA et al., 1999).

Após as etapas desenvolvidas *in vitro*, sucede-se a aclimatização das microplantas; etapa que pode ser decisiva na manutenção da sobrevivência do material multiplicado. Essa requer cautela, pois o material vegetal passará de uma condição de elevada umidade e baixa intensidade luminosa para o ambiente externo que é o inverso (DEBERGH; GEORGE, 2008).

As condições de crescimento em laboratório conferem às microplantas a falta de efetividade nas estratégias de sobrevivência comuns quando em ambiente natural, como por exemplo, a redução da produção de ceras e a não funcionalidade de estômatos (DEBERGH; GEORGE, 2008, GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), o que poderá causar estresse hídrico elevado nas mudas durante a transferência para o ambiente externo, levando-as a morte. Além disso, a planta passará de uma condição heterotrófica para uma condição autotrófica, na qual terá que realizar a fotossíntese para dar continuidade ao seu metabolismo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Considerando que a qualidade das microplantas oriundas das etapas *in vitro* é determinante para garantir bons rendimentos na aclimatização, estas são geralmente submetidas a uma pré-adaptação, conhecida como rustificação.

A rustificação é comumente obtida em ambiente *in vitro* durante a fase de enraizamento, para isso pode-se aumentar a intensidade luminosa, na sala de crescimento, disponibilizar mais CO<sub>2</sub> para as plantas e reduzir ou eliminar o açúcar da composição do meio de cultura; essas estratégias irão capacitar as plantas para a fotossíntese (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Ademais, a utilização de estratégias que reduzam a perda de água após a transferência para o ambiente *ex vitro* é muito importante para a retomada do crescimento do vegetal que irá passar a fazer fotossíntese em níveis ideais para sua sobrevivência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Isto é possível utilizando estufas ou proteções de embalagens plásticas a fim de manter a umidade do microambiente e controlar a perda de água pelas plantas aclimatizadas.

#### **2.4 Aplicações da micropropagação em espécies ornamentais da Chapada Diamantina**

As técnicas de micropropagação têm sido aplicadas há muitos anos na produção de mudas comerciais, principalmente de fruteiras e plantas ornamentais. Os trabalhos *in vitro* com plantas ornamentais da Chapada Diamantina são recentes, o primeiro foi realizado com a espécie *C. mucugensis* por Paixão-Santos (2002).

Outros pesquisadores investiram no desenvolvimento de protocolos de produção *in vitro* para espécies dessa região. Na maioria desses trabalhos busca-se o estabelecimento de protocolos eficientes e viáveis para atender a demanda do comércio ornamental, a fim de reduzir o extrativismo dessas espécies no seu ambiente natural, o que contribuirá para a conservação desses importantes recursos vegetais.

Os estudos realizados com a micropropagação de plantas ornamentais da Chapada Diamantina incluem espécies das famílias Eriocaulaceae, Cactaceae, Orchidaceae, Bromeliaceae e Veloziaceae.

#### **Sempre-vivas**

A família Eriocaulaceae, sempre-vivas, é o grupo ornamental da Chapada mais trabalhado com as técnicas de cultura de tecidos, no entanto, os trabalhos são restritos a apenas um gênero e duas espécies.

A espécie *Comanthera mucugensis* subsp *mucugensis* é a espécie mais estudada por seu grande valor comercial (GIULIETTI et al., 1996) e consequentemente, o risco de extinção ao qual está submetida (CNCFLORA, 2020). Possui trabalhos com diversas etapas da micropropagação como a germinação *in vitro* (PAIXÃO-SANTOS et al., 2003; SILVA et al., 2005), multiplicação (ALBUQUERQUE, 2013; CARMO, 2019; LIMA-BRITO et al., 2011; PAIXÃO-SANTOS et al., 2006; SANTOS et al., 2008), enraizamento (SILVA et al., 2005), rustificação (LIMA-BRITO et al., 2016) e aclimatização (LIMA-BRITO et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; SILVA, 2003), além de estudos de calogênese (GURGEL, 2017; PAIXÃO-SANTOS et al., 2008).

Os estudos realizados com a espécie *Comanthera curralensis* Moldenke limitaram-se ao estabelecimento *in vitro* (ALBUQUERQUE et al., 2016) e a multiplicação via organogênese (ALBUQUERQUE, 2013).

### **Cactáceas**

Na literatura são relatados trabalhos *in vitro* para sete espécies de cactos. *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo: multiplicação (TORRES-SILVA, 2018) e aclimatização de mudas (RESENDE et al., 2010); *Discocactus zehntneri*: estabelecimento e micropropagação (MARCHI, 2012) e morfogênese (MARCHI, 2016); *Pilosocereus gounellei*: estabelecimento e micropropagação (MARCHI, 2012); *Stephanocereus luetzelburgii*: estabelecimento e micropropagação (MARCHI, 2012) e multiplicação e calogênese (MARCHI, 2016); *Discocactus zehntneri*: estabelecimento e micropropagação (MARCHI, 2012) e morfogênese (MARCHI, 2016). *Pilosocereus pachycladus* F.Ritter e *Melocactus azureus* Buining & Brederoo: germinação *in vitro* (BÁRBARA et al., 2015), *Micranthocereus flaviflorus* subsp. *densiflorus* Buining & Brederoo P.J.Braun & Esteves e *Micranthocereus polyanthus* subsp. *alvinii* M. Machado & Hofacker: micropropagação (CIVATTI; MARCHI; BELLINTANI, 2017).

### **Bromélias**

Os trabalhos publicados com espécies de bromélias da Chapada Diamantina se resumiram a duas espécies. Para *S. mucugensis* foram realizados estudos de estabelecimento *in vitro* (BELLINTANI et al., 2007a), multiplicação (LIMA, 2008; LIMA et al., 2012), e aclimatização de mudas (BELLINTANI et al., 2007b); além de um protocolo completo de micropropagação via organogênese (LIMA; LIMA-BRITO; SANTANA et al., 2020; LIMA, 2016).

Com a espécie *Neoregelia mucugensis* Leme há protocolos de estabelecimento *in vitro* (BELLINTANI et al., 2007a) e aclimatização de mudas (BELLINTANI et al., 2007b).

### **Orquídeas**

Para orquídeas foram identificados trabalhos em quatro espécies: *Encyclia alboxanthina* Fowlie que abrange todas as etapas da micropropagação (SHERLOCK, 2009), *Cattleya elongata* Barb. Rodr.: estabelecimento e multiplicação *in vitro* (VIANA, 2013) e análise da estabilidade genética na multiplicação *in vitro* (NASCIMENTO, 2020), *Cyrtopodium polyphyllum* (Vell.) Pabst ex F. Barros: multiplicação *in vitro* (CRISTO, 2014), *Cyrtopodium aliciae* Linden: multiplicação *in vitro* (CRISTO, 2014).

### **Velózias**

Os estudos com as espécies de velózias da Chapada são escassos, sendo identificado apenas dois estudos de multiplicação *in vitro* com o candombá (*Vellozia pyrantha*), no qual os autores fizeram o uso de reguladores vegetais (BORGES, 2015) e do estresse térmico para induzir a multiplicação *in vitro* (BORGES, 2015; BORGES et al., 2020). Para a espécie *V. seubertiana* não há trabalhos com cultura de tecidos nem tampouco com outras técnicas de propagação para a espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal (UEHF) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), no município de Feira de Santana, Bahia.

### **Material vegetal**

Para a obtenção de sementes, cápsulas secas das espécies *Vellozia seubertiana* e *Vellozia pyrantha* foram coletadas no Parque Municipal de Mucugê, no município de Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia (latitude: 12° 59' 47" Sul, longitude: 41° 22' 11" Oeste).

### **Estabelecimento *in vitro* de duas espécies de *Vellozia***

As sementes foram lavadas em água corrente com uma gota de detergente por 10 minutos, em seguida foram levadas para câmara de fluxo laminar onde foram submersas em álcool a 70% por um minuto, e em hipoclorito de sódio 3% por 10 minutos com adição de 3 gotas de detergente neutro. Em sequência, as sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada esterilizada. Todo o processo foi realizado sob agitação manual.

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas ( $MS_{1/2}$ ) acrescido de  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $1\text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado, e gelificado com  $7\text{ g L}^{-1}$  de ágar (BORGES, 2015). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem à  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

As plantas germinadas *in vitro* foram utilizadas para estimular brotações na fase de multiplicação.

### **Multiplicação *in vitro* de duas espécies de *Vellozia***

Experimento1: Multiplicação *in vitro* de *V. seubertiana* em diferentes concentrações de BAP e ANA

O explante parte aérea oriundo de plantas de *V. seubertiana* (75 dias) e *V. pyrantha* (60 dias) germinadas *in vitro* foi inoculado em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio  $MS_{1/2}$  suplementado com  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $7\text{ g L}^{-1}$  de ágar e diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) combinados com a auxina ácido naftalenoacético (ANA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem à  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial  $2 \times 4$ , sendo duas concentrações de ANA e quatro concentrações de BAP, perfazendo oito tratamentos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições de quatro amostras, totalizando 20 tubos por tratamento (uma explante por tubo).

Aos 60 dias de cultivo foram avaliados: porcentagem de explantes com brotos (%EB), número de brotos por explante (NB), comprimento médio dos brotos (CMR) e massa seca das brotações (MS).

**Tabela 1:** Tratamentos utilizados na indução de brotos *in vitro* em plantas das espécies *Vellozia seubertiana* e *Vellozia pyrantha*.

<b>Tratamento</b>	<b>ANA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>BAP (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
T1	0,00	0,00
T2	0,00	4,44
T3	0,00	8,88
T4	0,00	17,76
T5	2,22	0,00
T6	2,22	4,44
T7	2,22	8,88
T8	2,22	17,76

Experimento 2: Multiplicação *in vitro* de *Vellozia seubertiana* em diferentes consistências do meio de cultura

Plantas estabelecidas *in vitro*, com 120 dias de cultivo, tiveram suas partes aéreas inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS  $\frac{1}{2}$  suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 8,75  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,22  $\mu\text{M}$  ANA, sendo acrescido (meio semissólido) ou não (meio líquido) de 7g L<sup>-1</sup> ágar. Nos tubos com meio líquido foram utilizadas pontes de papel como suporte para o explante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo testados dois estados físicos do meio de cultura (líquido e semissólido). Cada tratamento foi composto por cinco repetições de quatro amostras, totalizando 20 tubos por tratamento (um explante por tubo).

Aos 60 dias foram avaliados: porcentagem de explantes com brotos (%EB), número de brotos por explante (NB), comprimento médio dos brotos (CMR) e massa seca das brotações (MS).

### **Enraizamento *in vitro* de *Vellozia seubertiana***

Broto oriundo da multiplicação *in vitro*, com aproximadamente 2 centímetros de comprimento, foram individualizados e inoculados em potes contendo 50 mL de meio

MS ½ suplementado com 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 7gL<sup>-1</sup> de ágar e combinações da auxina ácido indolil-3-butírico (AIB) (0,00; 2,22 µM) e carvão ativado (0; 1 gL<sup>-1</sup>).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 2x2 (duas concentrações de AIB e duas concentrações de carvão ativado). Cada tratamento foi composto por cinco repetições de quatro amostras, totalizando 20 tubos por tratamento.

Aos 30 dias foram avaliados: porcentagem de enraizamento (%E), número de raízes por microplanta (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e da parte aérea (CPA) e número de folhas verdes (FV).

### **Aclimatização de *Vellozia seubertiana***

Microplantas enraizadas foram removidas do tubo de ensaio com o auxílio de uma pinça, tiveram suas raízes lavadas cuidadosamente com água destilada para a retirada dos resíduos de meio de cultura, a fim de evitar o ataque de microorganismos no ambiente externo. Em seguida, foram transplantadas para copos descartáveis de 200 mL contendo terra vegetal e vermiculita, na proporção 1:1 (BELLINTANI et al., 2007), e mantidas em bandejas com lâmina d'água em casa de vegetação cobertas com sombrite com 70% de luminosidade. Os copos foram cobertos com outro copo descartável por um período de 10 dias.

Aos 45 dias da transferência foram avaliados: porcentagem de sobrevivência das microplantas (%S), número de folhas verdes (NFV) e de folhas senescentes (NFS) e comprimento da parte aérea (CPA).

### **Condições de cultivo**

Todos os experimentos *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de  $26 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 14h luz e radiação fotossintética ativa de 60 µmol m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas frias. As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para manutenção da condição asséptica e os tubos vedados com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC).

### **Análise estatística**

Os dados foram avaliados mediante a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ou regressão para os dados quantitativos e

qualitativos, respectivamente, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOSE DISCUSSÃO

### Micropropagação de *Vellozia seubertiana*

A espécie *V. seubertiana* apresentou 80% de germinação *in vitro* (dados não apresentados). A utilização de plantas oriundas da germinação de sementes potencializa a manutenção da variabilidade genética, o que é importante para o estabelecimento inicial de coleções de estudo *in vitro* bem como de Bancos Ativos Germoplasma (BAGs). Uma alta variabilidade é interessante quando se pensa na cultura de tecido como uma estratégia de conservação *ex situ*. Já a manutenção da estabilidade genética da planta matriz é essencial para a produção de mudas clones destinadas ao mercado, e isto pode ser obtido pela propagação *in vitro* via direta, técnica utilizada neste estudo.

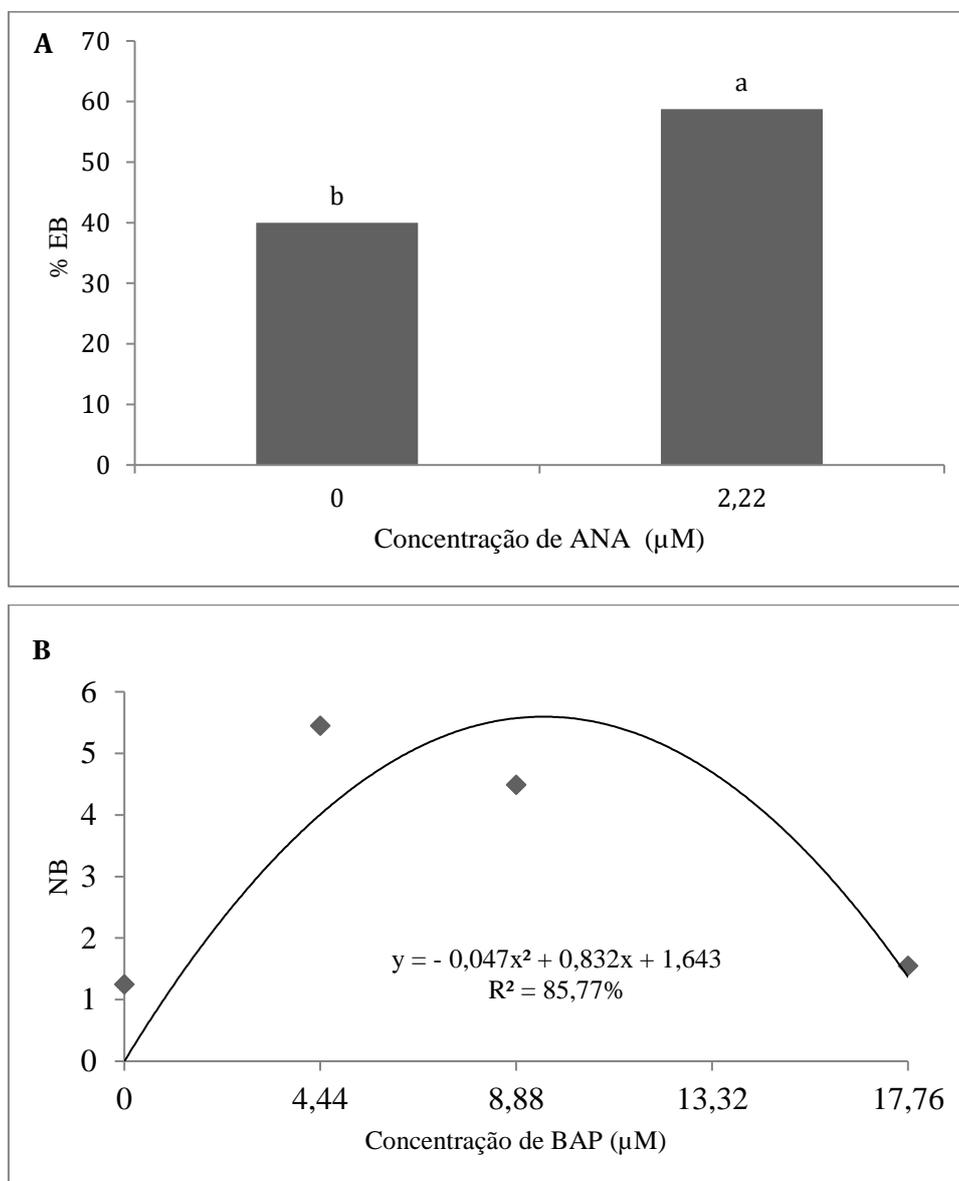
A análise de variância demonstrou efeito isolado da ANA para a variável porcentagem de explantes com brotos (%EB), interação dupla entre BAP e ANA para a variável número de brotos por planta (NB) e para as demais variáveis avaliadas não houve efeito significativo dos tratamentos testados (Tab. 2).

**Tabela 2:** Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de explantes (%S), porcentagem de explantes com brotos (%EB), número de brotos por explante (NB), comprimento médio dos brotos (CMB) e massa seca das brotações (MS) na multiplicação *in vitro* de *Vellozia seubertiana* em função de diferentes concentrações de BAP e ANA, cultivada *in vitro* por 60 dias

FV	GL	QUADRADO MÉDIO				
		%S	%EB	NB	CMB	MS
BAP	3	125.00 <sup>ns</sup>	1390.2 <sup>ns</sup>	9.89 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	0.017 <sup>ns</sup>
ANA	1	0.00 <sup>ns</sup>	3515.62 *	12.08 <sup>ns</sup>	0.11 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>
BAP*ANA	3	375.00 <sup>ns</sup>	307.29 <sup>ns</sup>	43.71*	0.08 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>
CV%		9.93	48.37	83.41	74.39	369,41

Na etapa de multiplicação de *V. seubertiana*, observou-se a indução de brotos na base do explante em todos os tratamentos testados. A presença da citocinina BAP no meio de cultura não influenciou a porcentagem de explantes com brotos (%EB). Já a adição da auxina ao meio de cultura, embora não essencial para a resposta dos explantes à formação de brotos *in vitro*, influenciou significativamente esta variável. Na concentração de 2,22

$\mu\text{M}$  de ANA a média observada para %EB foi superior ao tratamento sem essa auxina (Fig. 2a).



**Figura 2:** Efeito de ANA na porcentagem de explantes com brotos - %EB (A) e do BAP + 2,22  $\mu\text{M}$  de ANA no número de brotos por planta - NB (B) de *Vellozia seubertiana*, cultivada *in vitro* por 60 dias.

Estes resultados dão indícios de que a espécie possui auxina endógena em quantidade suficiente para a formação de brotos, no entanto, a multiplicação pode ser otimizada pela suplementação exógena do regulador vegetal ANA, resultando em balanços hormonais mais favoráveis a multiplicação.

Considerando que neste experimento foi utilizada apenas uma concentração de ANA e que foi obtida uma média de 58,75% de explante com brotos, sugere-se que

concentrações superiores sejam testadas no sentido de potencializar a multiplicação *in vitro*. Lima et al. (2012) também observaram médias inferiores a 60% utilizando baixas concentrações de ANA, 0,65 e 1,30  $\mu\text{M}$ , combinadas com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP em estudos com a bromélia *S. mucugensis*. Já Lima, Lima-Brito e Santana (2020) obtiveram altas porcentagens de explantes com brotos em *S. mucugensis* (99%) com a utilização do explante caule e maiores concentrações da auxina ANA, 2,60 e 5,20  $\mu\text{M}$ .

Para a espécie *C. mucugensis*, a sempre-viva de Mucugê, Lima-Brito et al. (2011) conseguiram 58% de explantes com brotos na ausência de regulador vegetal utilizando explante caule, o que revela que a espécie possui teores de hormônios endógenos suficientes para induzir morfogênese, semelhantes a espécie *V. seubertiana*. Essas duas espécies possuem hábitos de crescimento semelhantes e ocorrem na mesma região.

A interação BAP e ANA influenciou significativamente o número de brotos por explante. A análise de regressão para esta variável apresentou modelo polinomial quadrático na presença de ANA com ponto de máxima de 5,45 brotos por explante na concentração 8,75  $\mu\text{M}$  de BAP (Fig. 2b), enquanto na ausência da auxina os dados não se adequaram a um modelo matemático

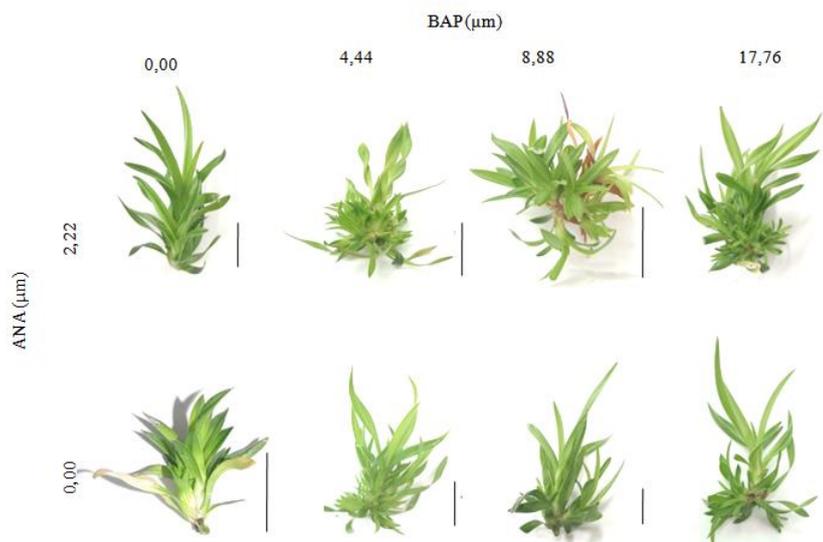
Em experimentos de multiplicação *in vitro* busca-se aperfeiçoar o balanço citocinina/auxina na tentativa de estabelecer um protocolo com produção satisfatória de brotos. Este é o primeiro estudo de multiplicação *in vitro* com a espécie *V. seubertiana* (Fig. 3), e foi observado que após atingir o ponto de máxima, em 8,75  $\mu\text{M}$  de BAP, a curva do gráfico de produção de brotos decaiu, mostrando que a citocinina sintética BAP tem efeito positivo na indução da multiplicação *in vitro*, mas também apresenta efeito tóxico e/ou inibitório, que pode ser desencadeado pelo uso de concentrações mais altas que o ideal dessas substâncias. Este é um comportamento inerente aos reguladores vegetais, os quais tanto promovem como inibem a mesma resposta fisiológica na planta, a depender de sua concentração.

Este mesmo padrão de comportamento da ação do regulador BAP foi observado na multiplicação da bromélia *S. mucugensis* por Lima; Lima-Brito; Santana (2020), em que os autores obtiveram o número aproximado de 7 brotos por explante em 8,92  $\mu\text{M}$  de BAP.

Garcia et al. (2021) também verificaram o efeito da citocinina BAP na promoção da multiplicação *in vitro*, em duas espécies de bromélias. Com a utilização de uma alta concentração de BAP (13,32  $\mu\text{M}$ ), os autores obtiveram médias de 14,5 brotos por

explante para a espécie *Aechmea miniata* (Beer) Baker e 10,5 para *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, ao final de 225 dias de cultivo.

As citocininas são necessárias na multiplicação *in vitro*, pois agem induzindo a quebra da dominância apical e o desenvolvimento de novas gemas axilares (GRATAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os hormônios auxinas e citocinina são essenciais para que as células avancem no ciclo celular, por isso, todos os vegetais possuem auxina e citocinina naturalmente, agindo em pontos específicos da regulação do ciclo celular, mais precisamente na passagem da fase G1 para a iniciação da síntese celular; as auxinas fazem o controle de ciclinas, sendo uma delas modulada por citocinina formando um complexo ativo que proporcionará a progressão do ciclo celular; as citocininas também participam da regulação da fase G2 para a mitose, induzindo uma fosfatase que ativa as cinases dependente de ciclina (KERBAUY, 2019).



**Figura 3:** Regeneração de brotos *in vitro* de *Vellozia seubertiana* em meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  suplementado com ANA e BAP, cultivada *in vitro* por 60 dias (Barra: 1 cm).

Neste trabalho o maior número de brotos foi 5,45, valor muito superior ao encontrado por Borges (2015) para esta variável na espécie *V. pyrantha*. A autora relatou um número máximo aproximado de apenas 0,3 brotos por planta com a utilização de cinetina e 0,2 brotos por explante utilizando BAP.

Freitas Neto (2009), trabalhando com subcultivos na multiplicação *in vitro* da espécie *V. flavicans*, observou no primeiro subcultivo valores inferiores a 2 brotos por explante e no terceiro subcultivo valores entre 6 e 7 brotos por explante utilizando a

citocinina BAP, nas concentrações 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ , o que confirma que esta citocinina é eficiente para a produção de brotos *in vitro* em espécies do gênero *Vellozia*.

Em todos os tratamentos utilizados, a variável porcentagem de sobrevivência das plantas apresentou médias superiores a 95%, o que indica que a parte aérea é um explante inicial promissor para a multiplicação de *V. seubertiana*, pois, além de possibilitar taxas elevadas de brotos, o explante inicial pode ser utilizado em um novo subcultivo, supostamente por isso foi utilizado por outros autores em espécies de velózias (FREITAS NETO, 2009; BORGES, 2015; BORGES et al., 2020). Similarmente, o explante parte aérea, obtido através da germinação de sementes, tem sido utilizado em outras espécies de arquitetura em roseta, a exemplo das bromélias (DIAS et al., 2020).

Em estudos preliminares, folhas de *V. seubertiana* foram utilizadas como explante, mas não apresentaram respostas morfogênicas nas condições testadas (dados não publicados). De forma similar para a bromélia *S. mucugensis* não foram obtidas respostas consideráveis nas variáveis porcentagem de explantes com brotos e número de brotos por explante utilizando a folha para iniciar a multiplicação (LIMA et al., 2012). No entanto, o explante folha mostrou-se promissor para a multiplicação *in vitro* da bromélia *A. ramosa* (FARIA et al., 2018), da mesma forma que segmentos caulinares foram promissores em *A. miniata* e *A. blanchetiana* (GARCIA et al., 2021), o que demonstra a importância da realização de estudos específicos.

### **Multiplicação *in vitro* de *V. seubertiana* em diferentes consistências do meio de cultura**

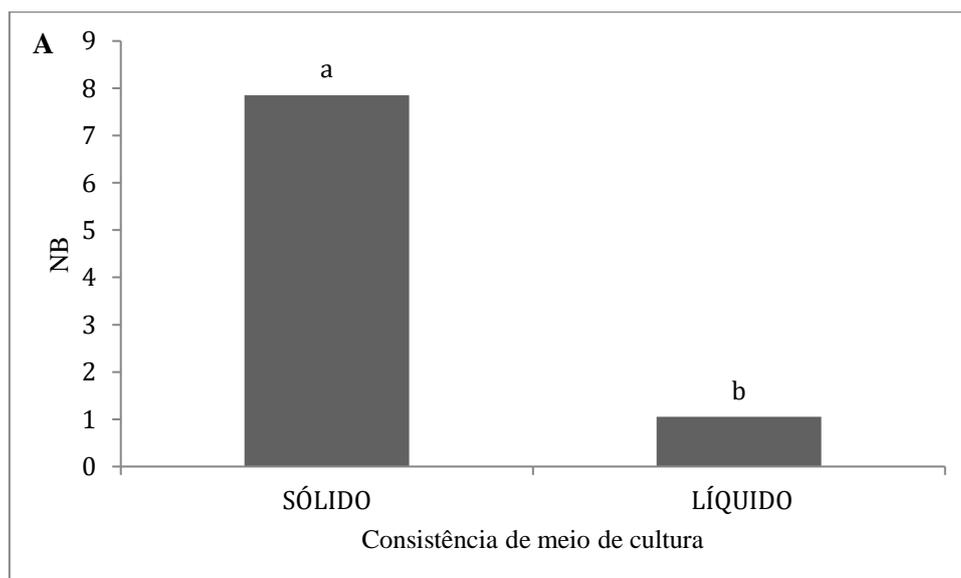
A análise de variância mostrou efeito significativo da consistência do meio de cultura para as variáveis número de brotos (NB), massa seca das brotações (MS) e comprimento médio de brotos (CMB). As demais variáveis não foram influenciadas significativamente pelo tratamento testado (Tab. 3).

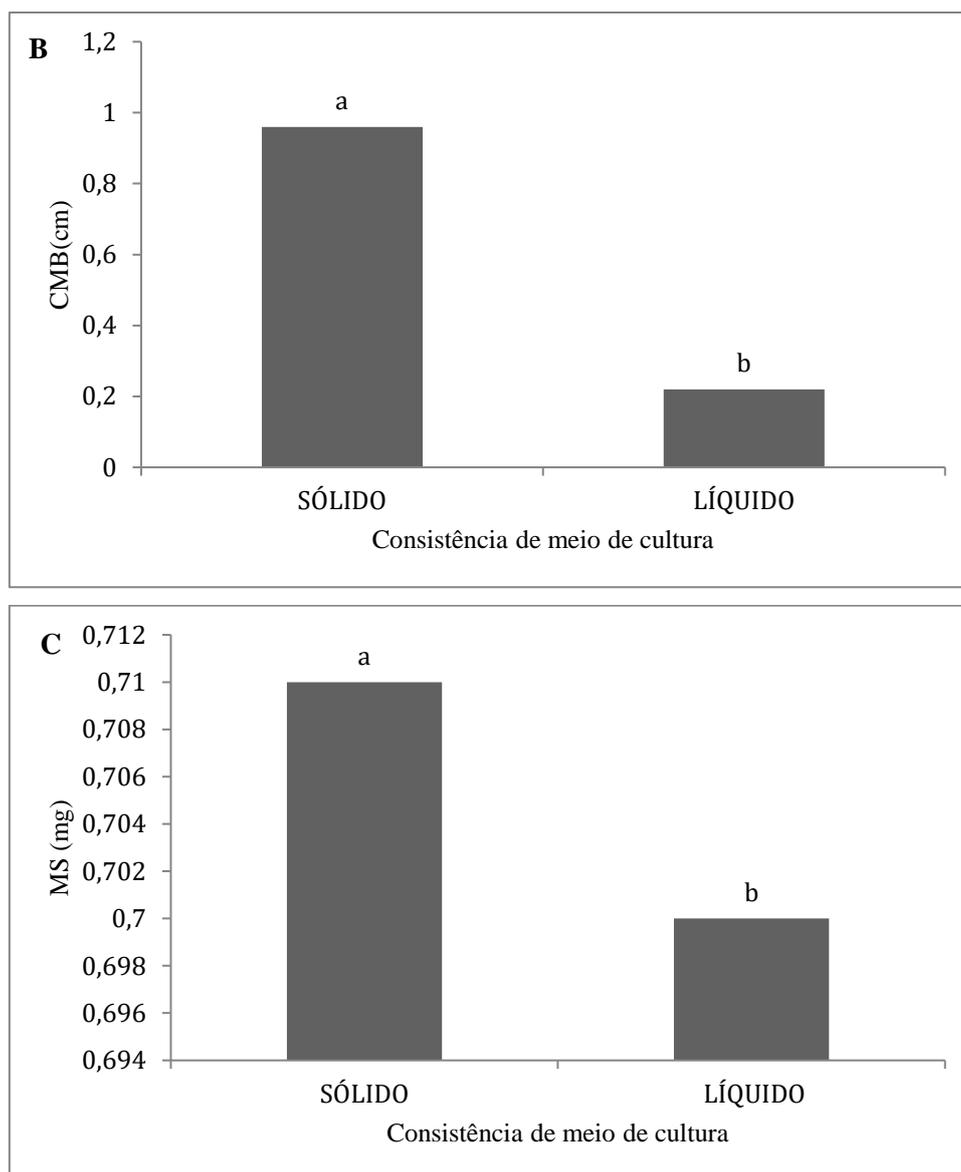
**Tabela 3:** Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de explantes (%S), porcentagem de explantes com brotos (%EB), número de brotos (NB), massa seca das brotações (MS) e comprimento médio dos brotos (CMB) na multiplicação *in vitro* de *Vellozia seubertiana* em função de diferentes consistências do meio de cultura, cultivada *in vitro* por 60 dias.

QUADRADO MÉDIO						
FV	GL	%S	%EB	NB	MS	CMB
CONSISTÊNCIA	1	62.5 <sup>ns</sup>	5062.5 <sup>ns</sup>	115.6*	0*	1,36*
CV%		8.11	60.23	66.77	0.76	62.91

O meio de cultura convencional, gelificado com ágar produziu maior número de brotos (7,85 brotos/explante) quando comparado ao meio de cultura líquido com ponte de papel (1,05 brotos/explante) (Fig. 4A). Em *Oncidium leuochilum*, espécie da família Orchidaceae, Scheidt et al. (2009) observaram respostas positivas à utilização de meio líquido, com 6,5 e 5,1 brotos/ explante, no entanto os autores utilizaram biorreatores para promover a oxigenação do cultivo.

Comportamento similar foi observado para as variáveis comprimento médio dos brotos e massa seca das brotações, que apresentaram médias superiores no meio sólido em comparação ao meio líquido (Fig. 4B,C).





**Figura 4:** Efeito da consistência de meio de cultura no número de brotos - NB (A), comprimento de maior broto CMB(B) e massa seca das brotações - MS(C) de *Vellozia seubertiana*, cultivada *in vitro* por 60 dias.

Na etapa de enraizamento observou-se a presença de raízes em todas as microplantas. Não foi observada interação entre as fontes de variação carvão ativado e AIB, às quais influenciaram isoladamente este processo (Tab. 4).

**Tabela 4:** Resumo da análise de variância para porcentagem de brotos enraizados (%E) número de raízes (NR), comprimento médio de raiz (CMR), comprimento de parte aérea (CPA) e folhas senescentes (FS) no enraizamento *in vitro* de *Vellozia seubertiana* em função de diferentes concentrações de AIB e carvão ativado, durante 30 dias.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO				
		%E	NR	CMR	CPA	FV
AIB	1	500 <sup>ns</sup>	0.27 <sup>ns</sup>	0.38 <sup>ns</sup>	0.67 <sup>ns</sup>	50.5*
CARVÃO	1	125 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	35.3*	9.81*	0.21 <sup>ns</sup>
AIB*CA	1	125 <sup>ns</sup>	2.21 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.21 <sup>ns</sup>	9.85 <sup>ns</sup>
CV%		22.10	46.85	44.67	26.24	51.58

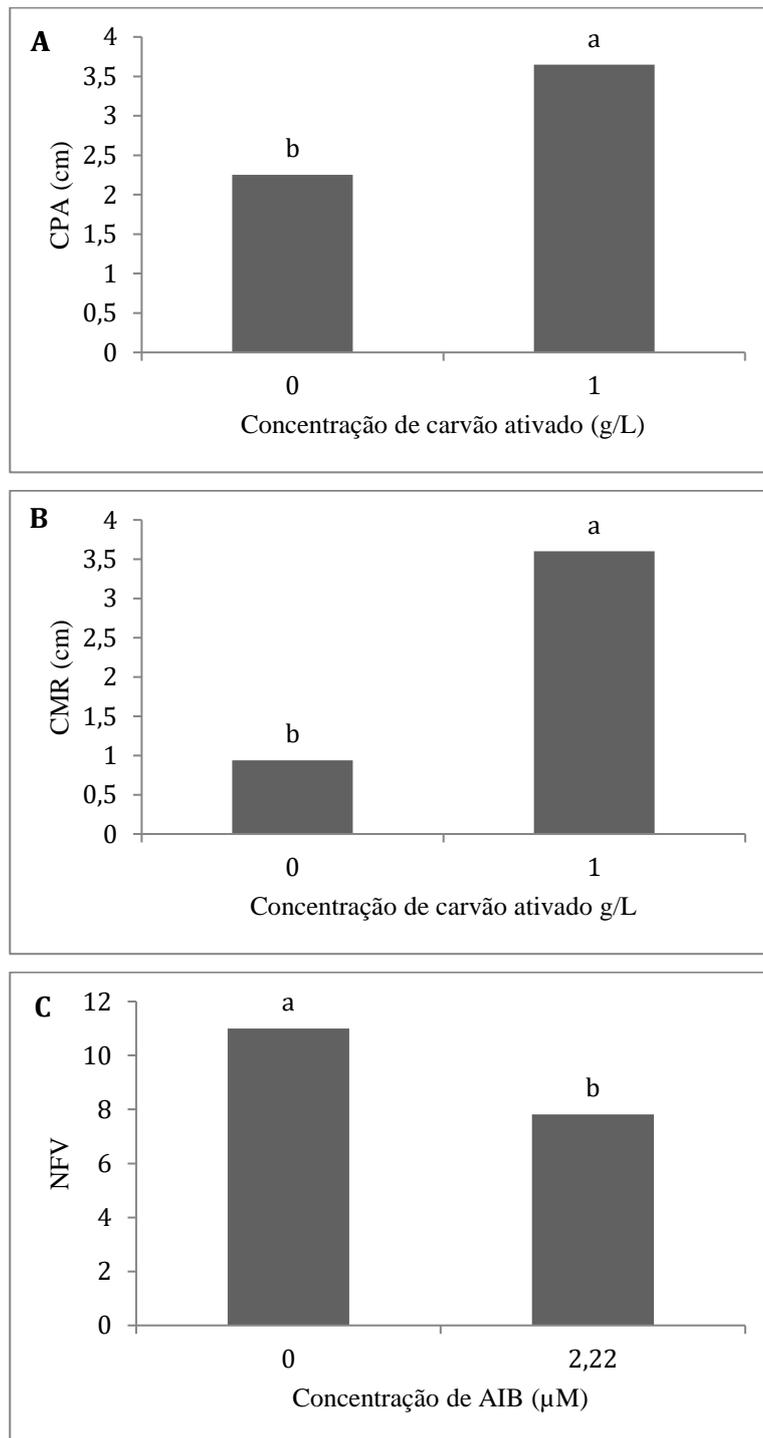
As maiores médias para comprimento da parte aérea e da raiz foram obtidas com a utilização do carvão ativado, sendo 3,65 e 3,60 cm, respectivamente, diferindo estatisticamente de quando o aditivo não foi utilizado (Figs. 5 A, B). Esses resultados foram semelhantes aos de Lima et al. (2012) que observaram efeito positivo do carvão para essas mesmas variáveis no enraizamento *in vitro* de *S. mucugensis*.

A utilização do carvão ativado no meio de cultura durante o enraizamento *in vitro* proporciona alguns benefícios, um deles é que sua cor propicia um meio escuro, sem luminosidade, com isso, a planta tende a enraizar por esta condição física (GEORGE, 2008). A outra função está relacionada à adsorção de elementos que podem inibir a rizogênese; tais substâncias podem estar presentes no próprio meio ou serem liberadas pelo vegetal durante o cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Com exceção do número de folhas verdes, as variáveis observadas na etapa de enraizamento não foram influenciadas pela auxina AIB, isso pode ser explicado pela presença de níveis endógenos suficientes à formação de raízes adventícias nos brotos de *V. seubertiana*, visto que, todos enraizaram.

O efeito negativo desta auxina na variável número de folhas verdes (Fig. 5C) pode ser atribuído ao balanço hormonal ultrapassar os limites tolerados pela espécie, obtendo os valores 7,82 quando se utilizou a auxina e 11 folhas verdes em meio livre de AIA. As auxinas sintetizadas naturalmente agem em diversos aspectos nas plantas, incluindo a senescência (KERBAUY, 2019), e o aumento da quantidade de auxina provocada pela adição externa pode ter influenciado no aumento da senescência das folhas *in vitro*, uma

vez que as plantas livres de auxina externa apresentaram maior número de folha verde (Fig. 5C), e menor número de folhas senescentes (dados não mostrados).



**Figura 5:** Enraizamento *in vitro* de *Vellozia seubertiana* durante 30 dias: efeito isolado do carvão no comprimento de parte aérea - CPA (A) e no comprimento médio de raiz - CR (B) e efeito isolado do AIB no número de folhas verdes - NFV (C).

Na etapa de aclimatização, não houve efeito significativo da auxina e do carvão ativado para nenhuma variável analisada. A porcentagem de sobrevivência das plantas

após 60 dias da transferência para o ambiente *ex vitro* variaram de 50% a 75%, entre os tratamentos testados. Isso indica que, embora tenham sido encontradas diferenças significativas para as variáveis analisadas na etapa de enraizamento, estas diferenças não influenciaram no processo de adaptação ao meio externo de *V. seubertiana*. Vale lembrar que todas as microplantas transferidas para os substratos estavam enraizadas.

Estes resultados divergem dos obtidos por Lima, Lima-Brito e Santana (2020) que observaram efeito positivo do cultivo em meio com carvão ativado para a aclimatização de *S. mucugensis*. Os autores indicam o uso de 1g L<sup>-1</sup> de carvão na fase de enraizamento das microplantas.

Durante a aclimatização de *V. flavicans*, Freitas Neto (2009) observou alterações na espessura da cutícula foliar, sendo muito delgadas nas amostras cultivadas *in vitro*, muito espessas em plantas em campo e intermediárias nas microplantas aclimatizadas, o que mostra que esta espécie do gênero *Vellozia* se adapta facilmente às condições de cultivo. A variação na espessura da cutícula foliar é um mecanismo produzido pelas plantas para evitar a perda de água e à consequente desidratação em situações de déficit hídrico, e certamente por isso esse autor observou variações nesse mecanismo nas amostras dos diferentes cultivos.

O resultado satisfatório da espécie *V. seubertiana* à aclimatização pode ser atribuída a um aparato rápido de adaptação ao ambiente externo, como descrita por Freitas Neto (2009) para a espécie *V. flavicans*, ou estar relacionado com a rusticidade de espécies vegetais ocorrentes nos campos rupestres, as quais possuem alta tolerância ao estresse hídrico e, em muitos casos, estômatos protegidos e metabolismo eficiente contra a desidratação (RAPINI, 2008). Estudos histológicos são indicados para uma melhor compreensão da etapa de aclimatização da espécie.

Os resultados obtidos indicam que o período para a obtenção de microplantas de *V. seubertiana* via organogênese direta, a partir de sementes, é de aproximadamente 230 dias (Fig. 6). Esse estudo, inédito para a espécie *V. seubertiana*, é a primeira descrição de um protocolo completo de propagação *in vitro* para o gênero *Vellozia*, portanto será útil para nortear futuros trabalhos com outras espécies da família Velloziaceae.



**Figura 6:** Planta no campo (A), cápsulas (B) e sementes (C) de *Vellozia seubertiana* e representação esquemática do protocolo de micropropagação via organogênese direta: crescimento inicial de plantas germinadas *in vitro* (D), multiplicação em meio com 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,22  $\mu\text{M}$  de ANA (E), brotos isolados da planta matriz (F), enraizamento (G), aclimatização (H) e microplantas aclimatizadas após 60 dias da transferência (I),

#### **Multiplicação *in vitro* de *Vellozia pyrantha* A.A.Conc.**

A espécie *V. pyrantha* apresentou 100% de germinação *in vitro* (dados não apresentados). A análise de variância mostrou efeito isolado de BAP e de ANA para o número de brotos por explante (NB). Para as variáveis porcentagem de explantes com

brotos (%EB), e massa seca de parte aérea (MS) observou-se apenas o efeito isolado de BAP; enquanto para porcentagem de sobrevivência das plantas(%S) e comprimento do maior broto (CMB) não houve efeito significativo dos tratamentos testados (Tab. 5).

Não houve interação entre o BAP e ANA para nenhuma das variáveis analisadas. Esses resultados divergem de observações encontradas para outras espécies que possuem arquitetura das folhas em roseta como *Aechmea ramosa* Mart. ex Schult. F (FARIA et al., 2018) e *S. mucugensis* (LIMA; LIMA-BRITO; SANTANA, 2020), em que a suplementação do meio de cultura com BAP e ANA, combinados, geraram resultados satisfatórios na produção de brotos *in vitro*.

**Tabela 5:** Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de explantes (%S), porcentagem de explantes com brotos (%EB), número de brotos (NB), massa seca das brotações (MS) e comprimento médio dos brotos (CMB) na multiplicação de *Vellozia pyrantha* em função de diferentes concentrações de BAP e ANA, cultivada *in vitro* durante 60 dias.

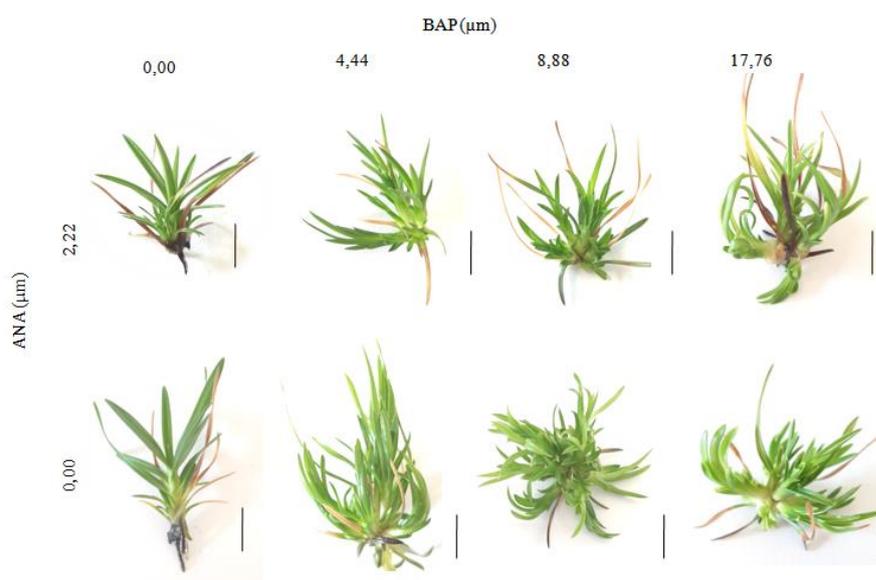
FV	GL	QUADRADO MÉDIO				
		%S	%EB	NB	MS	CMB
BAP	3	125.0 <sup>ns</sup>	2833.3*	39.28*	0.0002*	0.21 <sup>ns</sup>
ANA	1	62.5 <sup>ns</sup>	250.0 <sup>ns</sup>	17.26*	0 <sup>ns</sup>	0.007 <sup>ns</sup>
BAP*ANA	3	104.1 <sup>ns</sup>	1166.6 <sup>ns</sup>	4.50 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>
CV%		14.49	34.93	45.22	83.64	45.96

A presença de BAP aumentou significativamente o número de brotos em relação ao controle (ausência de citocinina) (Fig. 8A). De maneira semelhante, Lima, Lima-Brito e Santana (2020) observaram que quando se adicionou BAP ao meio de cultura houve aumento no número de brotos em *S. mucugensis*.

Em um trabalho com a mesma espécie foi observado um número aproximado de 0,2 brotos/explante quando se utilizou BAP (0.0; 2.22; 4.44 µM) e de 0,3 brotos/ explante utilizando cinetina, (0.0; 2.32; 4.64 µM), que também é um regulador pertencente à classe das citocininas (BORGES, 2015); valores esses muito inferiores aos obtidos neste trabalho, que foi aproximadamente 5 brotos/explante (Fig. 8A). Já em *V. flavicans*, Freitas Neto obteve valores de 0,1 a 1,7 brotos/explante utilizando BAP (2,22 e 4,44 µM), CIN

(2,32 e 4,64  $\mu\text{M}$ ) e AIB (1,48  $\mu\text{M}$ ), combinados. Uma das razões para esses valores baixos pode ter sido as baixas concentrações de reguladores utilizadas por esses autores e o uso do carvão ativado por Borges (2015) na composição do meio de cultura de multiplicação; essa substância possui propriedade adsorvente e pode ter reduzido a eficiência da auxina e da citocinina, não proporcionando um balanço de reguladores ideal para uma produção satisfatória de brotos.

As diferentes tentativas de obtenção de protocolos de multiplicação *in vitro* com a utilização de variados tipos de reguladores vegetais sintéticos e diferentes combinações dos mesmos são muito importantes, pois a mesma espécie pode apresentar respostas diversas aos reguladores. Isto ocorre porque cada vegetal em cada fase de vida ou ambiente possuem níveis diferentes de hormônios vegetais e níveis desiguais de competência celular para o desenvolvimento da morfogênese, o que poderá ser balanceado no cultivo *in vitro* pelo uso dos reguladores de crescimento sintéticos.

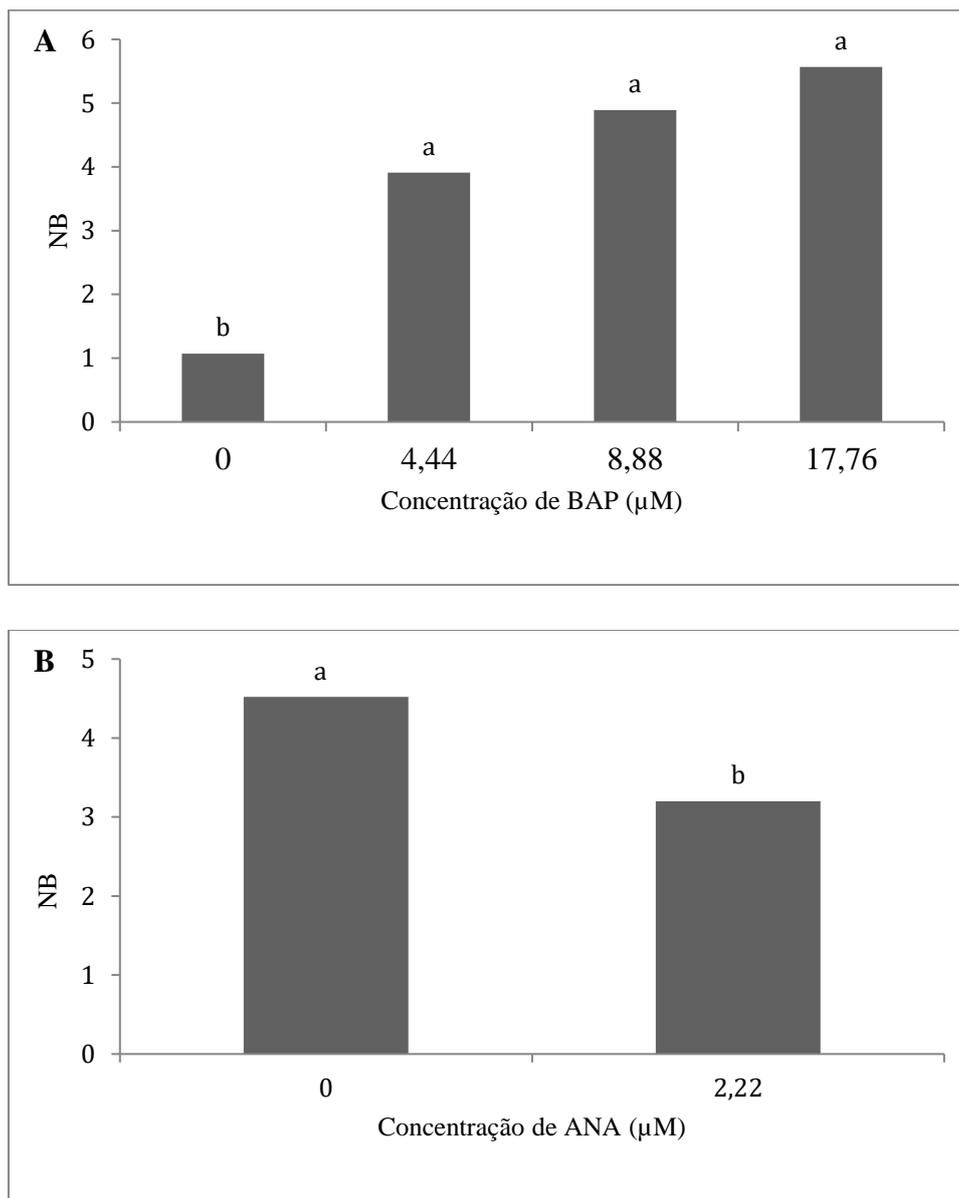


**Figura 7:** Regeneração de brotos *in vitro* de *Vellozia pyrantha* em meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  suplementado com ANA e BAP ( $\mu\text{M}$ ), cultivada *in vitro* por 60 dias (Barra: 1 cm).

A presença de ANA na concentração testada (2,22  $\mu\text{M}$ ) reduziu o número de brotos significativamente (Fig. 8B) e, apesar de ter sido utilizado uma concentração de ANA combinada com concentrações de BAP, pode-se observar que a *V. pyrantha* não necessitou de auxina para produzir um número razoável de brotos, provavelmente por

possuir índices endógenos suficientes para alcançar um balanço hormonal citocinina/auxina favoráveis às brotações.

Da mesma forma, algumas espécies de bromélias não carecem de suplementação com auxina no processo de multiplicação *in vitro*, como é o caso das espécies *A. Miniata* e *A. blanchetiana*, que produziram 14,5 e 10,5 brotos por explante, respectivamente, utilizando apenas citocinina (13,32  $\mu\text{M}$  de BAP) (GARCIA et al., 2021).



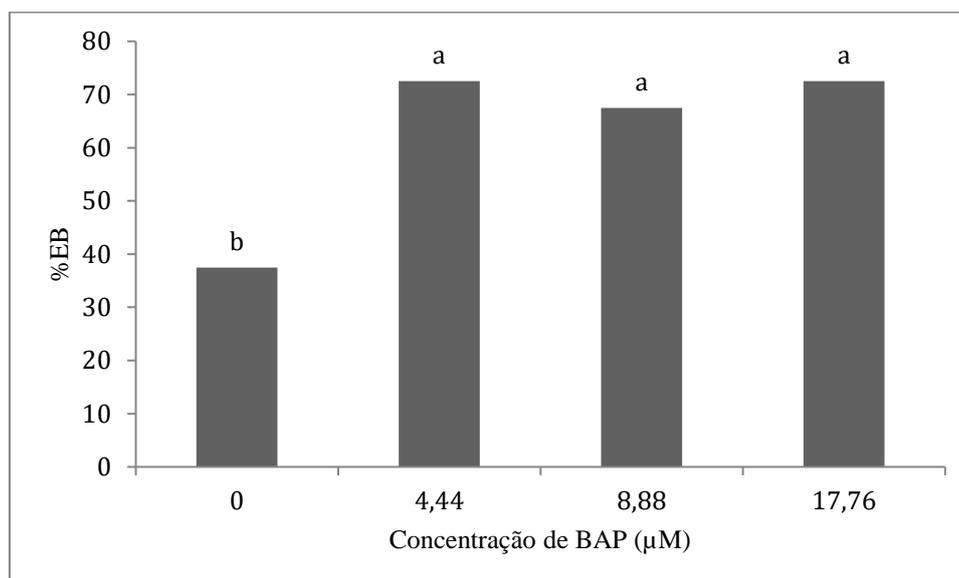
**Figura 8:** Efeito de BAP (A) e de ANA (B), isolados, no número de brotos (NB) de *Vellozia pyrantha*, cultivada *in vitro* por 60 dias.

A presença de BAP aumentou significativamente a porcentagem de explantes que apresentaram brotos, que variou de 37,5% a 72,5% (Fig. 9). O mesmo comportamento

apresentado para o número de brotos ocorreu para a variável porcentagem de explantes com brotos, no qual apenas a ausência da citocinina se diferenciou das demais concentrações testadas e a presença de BAP proporcionou um aumento.

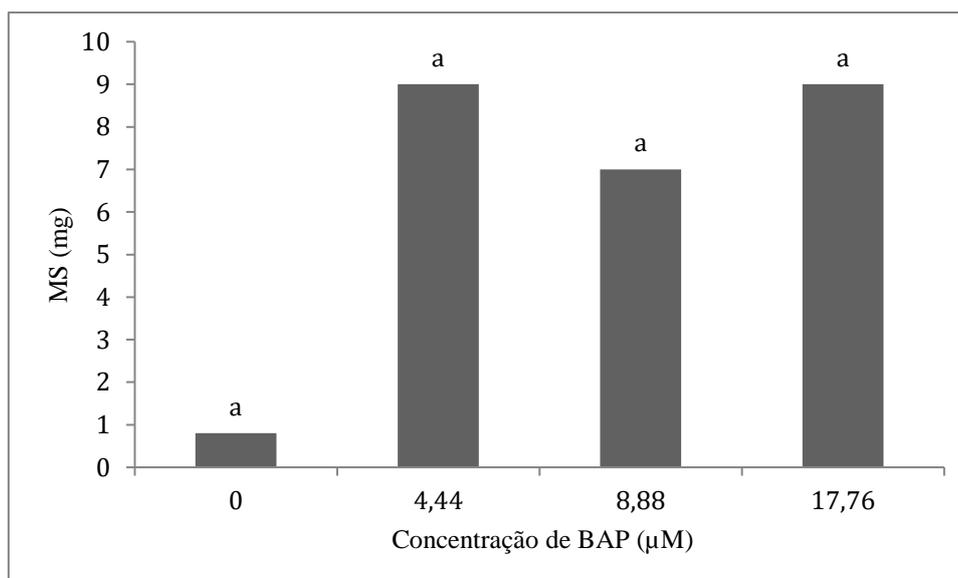
Borges (2015) também observou o efeito promotor de BAP para essa variável em *V. pyrantha*, no qual se obteve médias superiores em todos os tratamentos com adição de citocinina, diferindo significativamente apenas do controle.

A porcentagem de explantes com brotos variou de 37 a 72%, valores muito superiores aos encontrados por Borges (2015) que obteve apenas 8% de explantes com brotos utilizando BAP (2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) e 21% utilizando cinetina (2,32 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) para a mesma espécie, valores esses que não alcançam a porcentagem mínima encontrada no presente trabalho (37,5 %) no meio sem adição do BAP.



**Figura 9:** Efeito de BAP na porcentagem de explantes com brotos (%EB) em *Vellozia pyrantha*, cultivada *in vitro* por 60 dias.

A massa seca das brotações variou de 0,8 mg a 9 mg (Fig. 10), não havendo diferença estatística entre as concentrações de BAP. As plantas ocorrentes nos campos rupestres possuem a característica de crescimento e desenvolvimento lentos; as baixas médias observadas para a variável massa seca das brotações nas diferentes concentrações de BAP pode estar relacionada a este aspecto, no entanto a ausência de diferença estatística entre o controle e os tratamentos com BAP pode estar relacionada ao alto coeficiente de variação observado.



**Figura 10:** Efeito de BAP na massa seca das brotações (MS) em *Vellozia pyrantha*, cultivada *in vitro* por 60 dias.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a micropropagação é uma técnica promissora para a produção das espécies *Vellozia seubertiana* e *Vellozia pyrantha*.

A produção de mudas *in vitro* da espécie *Vellozia seubertiana* pode ser conduzida em meio MS com metade das concentrações salinas suplementado com 8,75 µM de BAP e 2,22 µM de ANA para a produção de brotos, enraizando-os em meio MS1/2 com 1 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado, e as microplantas aclimatizadas com vermiculita e terra vegetal na proporção 1:1 em casa de vegetação. O período para obtenção de mudas de *V. seubertiana* a partir de sementes é de aproximadamente 230 dias.

A produção de brotos de *Vellozia pyrantha* é satisfatória em meio MS com metade das concentrações salinas suplementado com 4,44µM de BAP em período de 60 dias. É necessária a continuação desse trabalho para a obtenção de um protocolo completo de micropropagação de candombá.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M. M. S. et al. *In vitro* establishment of *Comanthera curralensis*, “sempre viva” native of Chapada Diamantina – Bahia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.6, p.991-995, 2016.
- ALBUQUERQUE, M. M. S. **Micropropagação e conservação *in vitro* de “sempre-vivas” nativas da Chapada Diamantina – BA**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2013.
- ALMEIDA, R. O. de. Aprendizados sobre o candombá... E sobre as relações entre sujeitos... E entre sujeitos e candombás... **Candombá – Revista Virtual**, v. 2, n. 1, p. 37–49, 2006.
- ALVES, R. J. V.; SILVA, N. G. da. O Fogo é Sempre um Vilão nos Campos Rupestres? **Biodiversidade Brasileira**, n. 2, 120-127, 2011.
- AYENSU, E. S. Biological and Morphological Aspects of the Velloziaceae. **Biotropica**, v. 5, n. 3, p. 135-149, 1973.
- AYENSU, E. S.; SMITH, L. B. **A revision of American Velloziaceae**. Smithsonian Institution Press. Washington, 1976.
- BÁRBARA, E. P. S. et al. Germinação e criopreservação de sementes de Cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia**, v. 9(2): 91-96, 2015.
- BARBOZA, S. B. S. C. et al. Cultivo inicial *in vitro* de gemas axilares de *Ananas comosus* (L.) Merr., em meio líquido/sólido, na presença/ausência de luz. **Ciência e agrotecnologia**, v. 33, p. 1832 -1836, 2009.
- BELLINTANI, M. C. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1101-1103, jul. 2007a.
- BELLINTANI, M. C. et al. Efeito da Ventilação *in vitro* na Aclimatização de Plantas Micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1098-1100, jul. 2007b.
- BORGES, B. P. S. **Regeneração *in vitro* de Velloziasincorana Ayensu & Smith**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – DCBIO, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- BORGES, B. P. DOS S., et al. Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.143, p.709–713, 2020.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA, v.1, p.864, 1998.

CARMO, L. P. **Utilização de macroalgas marinhas no cultivo *in vitro* de plantas: bioensaios com *Physalis peruviana* L. (Solanaceae) e *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul. (Eriocaulaceae)**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2019.

CARMO, L. P.; MOURA, C. W. N.; LIMA-BRITO, A. Red macroalgae extracts affect in vitro growth and bud formation in *Comanthera mucugensis* (Giul.) LR Parra & Giul., an endemic dry flower species from the Chapada Diamantina (Brazil). **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 29-34, 2020.

CIVATTI, L. M.; MARCHI, M. N. G.; BELLINTANI, M. C. Micropropagation of two species of *Micranthocereus* (Cactaceae) with ornamental potential native to Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 749-762, 2017.

CONCEIÇÃO, A.A.; ORR, B.J. Post-flowering and fruiting in *Vellozia* *sincorana*, a caulescent set-plant endemic to Northeast Brazil. **Acta Botanica Brasilica**. V.26, n.1, p. 94-100. 2012.

CONCEIÇÃO, A. A. et al. Campos rupestres. In: JUNCÁ, F. A.; FUNCH, L.; ROCHA, W. **Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.

NEVES, S. P. S. **Fenologia, biologia floral e polinização de espécies de Velloziaceae endl. em área de Campo Rupestre na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de Pós- Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

CONCEIÇÃO, A.A. A hot case for conservation: *Candombá* (*Vellozia pyrantha*), a flammable plant endemic to a national park is used to make a fire and threatened by fire suppression policy. **Journal for Nature Conservation**, 2018.

CNCFlora, 2020. **Eriocaulaceae**. Disponível em: <[Centro Nacional de Conservação da Flora - CNCFlora \(jbrj.gov.br\)](http://Centro Nacional de Conservação da Flora - CNCFlora (jbrj.gov.br))> Acesso em: 10/04/2020, 10:45.

COSTA, F. N.; SANO, P. T., TROVO, M. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**. v.4, 2008.

- COSTA, F. H. DA S. et al. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n.1, p. 41-46, jan./fev., 2007.
- COSTA, A. N. et al. Cultivo *in vitro* da bananeira Prata Anã clone Gorutuba, em meio líquido, agitado e estacionário. **Ceres**, v. 63, n.3, p. 277-281, mai/jun, 2016.
- CRISTO, C. G. De. **Multiplificação *in vitro* das espécies *Cyrtopodium polyphyllum* (Vell.) Pabst ex F. Barros e *C. aliciae* Linden e fidelidade genética na micropropagação de *C. polyphyllum* (Orchidaceae)**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.
- DIAS, J. da S. Multiplificação *in vitro* de bromélias *Aechmea aquilega* e *Bromelia balansae*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p.17464-17476, 2020.
- DEBERGH, P. C.; GEORGE, E. F. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E.F. et al. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd Edition. v. 1. The Background. Springer, 2008.
- FARIA, D. V. et al. *In vitro* morphogenesis and micropropagation of *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. Ex Schult.f. (Bromeliaceae) from leaf explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 54, p.530,536, 2018.
- FERREIRA, F. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FREITAS NETO, O. G. **Micropropagação e anatomia foliar de canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult f. – Velloziaceae) em diferentes condições ambientais**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Botânica do Instituto de Ciências biológicas da Universidade de Brasília. Brasília, 2009.
- GARCIA, F.R. et al. Micropropagação de *Aechmea miniata* e *Aechmea blanchetiana*. **Rodriguésia**, v.72, 2021.
- GIULIETTI, A.M. et al. Estudos em sempre vivas: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta botânica brasílica** v. 10, p. 329-377, 1996.
- GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta botânica brasílica**, 1(2):179-193, 1988.
- GRATTAPAGLIA, D. ; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES. A. C.; CALDAS. L. S.; BUSO. J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA, v.1, p.864, 1998.

GURGEL, Z.E.R. **Micropropagação e Conservação de *Comanthera mucugensis* Giul. subs. *mucugensis***. Dissertação (mestrado) - Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2017.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture** (3° Ed). Springer, v.1, 2008.

GUERRA, M. P. et al. Embriogênese somática e sementes sintéticas. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568, 1999.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Copyrigh, 2019.

LIMA, A. P. P. S. **Micropropagação e conservação *in vitro* de *Orthophytum mucugense* WAND. E CONCEIÇÃO**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.

LIMA, A. P. P.; LIMA-BRITO, A.; SANTANA, J. R. F. de .Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. **Ciência Rural**, v.50, n.2, 2020.

LIMA, C. O. C. et al. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.2, p.249-254, 2012.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* GIUL. SUBSP. *Mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 502-510, 2011.

LIMA-BRITO, A. et al. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, jan-mar, 2016.

LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. das G. L.

Revision of *Orthophytum* (Bromeliaceae): the species with sessile inflorescences.

**Phytotaxa**, v.13, p.1-26, 2010.

MARCHI, M. N. G. **Micropropagação e conservação de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Strophocereus luetzelburgii*, cactos nativos da Chapada Diamantina, Bahia**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

MARCHI, M. N. G. **Aspectos fisiológicos, anatômicos e moleculares da propagação e conservação *in vitro* de espécies de cactos endêmicos da Bahia**. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.

MMA; ICMBio. **Plano de Manejo: Parque Nacional da Chapada Diamantina.**

Versão preliminar – Documento de trabalho. Brasília, 2007.

MMA, 2006. **Estudo faz inventário de espécies na Chapada Diamantina.** Disponível em: <[Estudo faz inventário de espécies na Chapada Diamantina — Português \(Brasil\) \(www.gov.br\)](http://www.gov.br)> Acesso em: 07/10/2021.

MELLO-SILVA, R. 2005. Velloziaceae *In*: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Martins, S.E., Kirizawa, M., Giulietti, A.M. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo.** Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 4, pp: 371-376.

MELLO-SILVA, R. 2015. *Velloziaceae*. *In*: **Lista de Espécies da Flora do Brasil.**

Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15114>>. Acesso em: 08 de maio, 2020.

MELLO-SILVA, R. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Velloziaceae. **Rodriguésia**, v.69, n.1, p. 259-262, 2018.

MENGARDA, L. H. G. et al. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.6, p.469-474, Nov./Dec. 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG. F.A revised medium for rapid growth and bioassays with to bacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.6 p. 473-479. 1962

MURASHIGE, T. Plant propagation throug tissue cultures. **Plant Physiologia**, v.25, p. 135-66, 1974.

NASCIMENTO, G. S. **Análise da estabilidade genética na micropropagação de *Cattleya elongata* BARB. RODR., orquídea endêmica da Chapada Diamantina-Bahia.** Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana 2020.

NEVES, S. P. S.; CONCEIÇÃO, A.A. Vegetação em afloramentos rochosos na Serra do Sincorá, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.7, n.1, p. 36-45, 2007.

NEVES, S. P. S. **Fenologia, biologia floral e polinização de espécies de Velloziaceae endl. em área de Campo Rupestre na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil.**

Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de Pós- Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

NEVES, S. P. S.; CONCEIÇÃO, A.A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. **Acta botânica brasílica**. v.24, n.3, p. 697-707, 2010.

- OLIVEIRA, R. P. DE; LONGHI-WAGNER, H. M.; GIULIETTI, A. N. O gênero *Ichnanthus* (Poaceae: Paniceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v.17, n.1,p. 49-70. 2003
- PAIXÃO-SANTOS, J. **Germinação e Micropropagação de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti (Euriocaulaceae)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de pós-graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2002.
- PAIXÃO-SANTOS, J. da et al. Indução de calos em sempre- Indução de calos em sempre-viva ( *Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 30, n. 2, p. 127-131, 2008.
- PAIXÃO-SANTOS, J. et al. Germinação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 3, n. 1, dez. 2003.
- PAIXÃO-SANTOS, J. et al. Ajuste do meio MS para o cultivo “*in vitro*” de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti, espécie ameaçada de extinção. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 6, n. 1, p.36-39, 2006.
- PEREIRA, L. S. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungion survival and growth of micro propagated *Comanthera mucugensis* spp. *mucugensis* (Eriocaulaceae). **African Journal of Agriculture Research**. v. 12, n.20, p. 1772-1780, 2017.
- PNCD, 2009. **Incêncios**. Disponível em:<[parnachapadadiamantina.blogspot.com/p/incendios-florestais.html](http://parnachapadadiamantina.blogspot.com/p/incendios-florestais.html)> Acesso em 07/04/2020, 11:15.
- ROCHA, W. et al. Avaliação ecológica Rápida da Chapada Diamantina .In: JUNCÁ, F. A.; FUNCH, L.; ROCHA, W. **Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina**. Brasília-DF, Ministério do Meio Ambiente, 2005.
- RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v.4, n.1-2, 2008.
- RESENDE, S. V.; LIMA-BRITO, A.; SANTANA, J.R.F. de. Influência do substrato e do enraizamento na aclimatização de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo propagados *in vitro*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n.6, p. 803-809, 2010.
- RESENDE, S. V. et al. *In vitro* seed germination and plant growth of “cabeça-de-frade” (Cactaceae). **Revista Caatinga**, v. 34, n. 1, p. 1 – 8, 2021.

- RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA-PINTO, DOS S.; TEIXEIRA, S. L. **Alternativas para a redução de custos na produção de mudas *in vitro***. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, 2013.
- ROCHA, W. et al. Avaliação ecológica Rápida da Chapada Diamantina. *In*: JUNCA, F. A.; FUNCH, L.; ROCHA, W. **Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina**. Brasília-DF, Ministério do Meio Ambiente, 2005.
- SILVA, J. R. S. **Enraizamento e aclimatização de plântulas de sempre-vivas-de-Mucugê, *Syngonanthus mucugensis* GIULIETTI (Eriocaulaceae), produzidas *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de PósGraduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2003.
- SIQUEIRA, D. L. DE et al. Micropropagação da bananeira ‘Maçã’, cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. *Ceres*, v. 60, n.6, p. 745-751, 2013.
- SHERLOCK, E. M. **Propagação *in vitro* de *Encyclia alboxanthina* Fowlie (Orchidaceae): espécie endêmica da Chapada Diamantina- Bahia**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
- SCHEIDT, G. N. et al. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. *Biociências*, v. 17, n. 1, p. 82-85, 2009 .
- TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D.C. **Cacti of Eastern Brazil**. Royal Botanic Gardens, Kew.2004.
- TORRES-SILVA, G. et al. *In vitro* conservation and genetic diversity of threatened species of *Melocactus* (Cactaceae). *Biodiversity and Conservation*, v.30, p.1067–1080, 2021.
- VELLOSO, A. L. et al. **Resultados do seminário de planejamento ecorregional da Caatinga/ Aldeia – PE**. Recife: Copyright. Associação plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental do Brasil, 2002.
- VIANA, C. M. **Propagação e conservação *in vitro* de *Cattleya elongata* BARB. RODR. (Orchidaceae JUSS.)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biodiversidade) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.