



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



FABIO RIBEIRO GARCIA

MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
BROMELIÁCEAS

FEIRA DE SANTANA-BA
2013

FABIO RIBEIRO GARCIA

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
BROMELIÁCEAS**

FEIRA DE SANTANA-BA
2013

FABIO RIBEIRO GARCIA

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
BROMELIÁCEAS**

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

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

FEIRA DE SANTANA-BA
2013

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Garcia, Fabio Ribeiro

G199m Micropropagação e conservação *in vitro* de bromeliáceas /
Fabio Ribeiro Garcia. – Feira de Santana, 2013.

80 f. : il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.

Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2013.

1. Bromeliáceas - Conservação. 2. Bromélias. I. Santana, José
Raniere Ferreira de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de
Santana. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Alone Lima Brito
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Dra. Moema Cortizo Bellintani
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Dr. José Raniere Ferreira de Santana
Orientador e Presidente da Banca

À minha mãe, pelo amor dedicado a mim em todos os momentos da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fonte da minha inspiração, força e dedicação.

Ao meu pai que mesmo não estando mais entre nós, está sempre presente na minha vida.

A minha mãe, pela compreensão, paciência, por tanto amor e principalmente por essa pessoa que me surpreende a cada dia. Te amo incondicionalmente!

Aos meus irmãos, Tati, Tici e Fabricio, pelo respeito, admiração e amor. À minha sobrinha, Letícia, por encher a minha vida de alegria e muito amor.

Ao meu amigo, irmão e companheiro, Leandro Cerqueira, pelo carinho, companheirismo. Te amo!

Aos amigos que se tornaram irmãos, Pedro Silva e Rone Borges. Amo vocês!

Ao meu amigo Diego Moraes, pela paciência, e pelos conselhos nos momentos difíceis. Muito obrigado!

À Todos os amigos que conquistei em Feira de Santana, em especial, Diego Cartaxo.

Ao meu orientador, Prof^o José Raniere, pela oportunidade e orientação.

As doutoras Alone Brito e Moema Bellintani, pelas correções, ensinamentos e participação na minha banca examinadora.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, Mara, Priscila, Tecla, Cristina, Bruno, Bárbara, Andressa e Emile, obrigado todos pela amizade, pela ajuda, e companheirismo.

A todos os colegas de turma, em especial, Camila, Mara, Anderson, Mariana, Ariana, Diego e Daniel.

A professora Maria Angélica por ter me orientado durante a graduação, e ter despertado em mim o interesse na cultura de tecidos. Aprendi muito com você, como orientadora, mas principalmente como pessoa. Obrigado por tudo!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela contribuição na minha formação, em especial à professora Sandra Queiroz.

Ao Alberto, secretário do curso, pela atenção sempre que requisitado.

A 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 e pessoal.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”. (John F. Kennedy)

RESUMO

Aechmea blancheteana (Baker) L.B. Smith e *Aechmea miniata* (Beer) Baker são espécies de bromélias nativas do Brasil que possuem grande potencial para uso como planta ornamental, além de relevante importância ecológica. Considerando a grande devastação de Mata Atlântica, atualmente com 7,3% de sua área original preservada, onde cerca de 70% das bromélias são endêmicas é importante o estabelecimento de métodos propagação e conservação *ex situ* com o objetivo de preservar esse germoplasma e evitar uma erosão genética irreversível. Assim, o objetivo deste trabalho estabelecer os protocolos de micropropagação e conservação *in vitro* de *A. blancheteana* e *A. miniata*. No primeiro capítulo, para a multiplicação *in vitro*, foram utilizadas diferentes concentrações de BAP e na fase de enraizamento foram testadas diferentes concentrações das auxinas AIA, AIB e ANA. No segundo capítulo foram testadas a combinação de diferentes concentrações das auxinas Picloram e 2,4-D e da auxina 2,4-D combinada com a citocinina BAP na indução de embriões somáticos. No terceiro capítulo, foi avaliado o efeito dos agentes osmóticos, sacarose, sorbitol e manitol na conservação *in vitro* de *A. blancheteana*. Para a micropropagação o melhor resultado foi obtido em meio MS suplementado com 4,44 μ M de BAP. Para a indução e regeneração de embriões somáticos, a concentração 22,5 μ M de 2,4-D foi a mais eficiente. Independente da concentração, o manitol foi mais eficiente para a conservação *in vitro* de *A. blancheteana* por 12 meses.

Palavras-chave: Reguladores vegetais. Embriogênese. Agente osmótico. Crescimento mínimo.

ABSTRACT

Aechmea blancheteana (Baker) LB Smith and *Aechmea miniata* (Beer) Baker bromeliad species are native to Brazil and have great potential for use as an ornamental plant, and a relevant ecological importance. Considering the devastation of the Atlantic, currently 7.3% of its original area preserved and where about 70% are endemic bromeliad is important to establish methods of propagation and ex situ conservation in order to preserve this germplasm and avoid irreversible genetic erosion. Thus, the aim of this work was to establish protocols and micropropagation *in vitro* conservation of *A. blancheteana* and *A. miniata*. In the first chapter, for multiplication *in vitro*, we used different concentrations of BAP and for rooting tested different concentrations of auxins IAA, IBA and NAA. In the second chapter we tested two protocols, was first used in MS medium supplemented with different concentrations of auxin Picloram and 2,4-D combined with BAP and the second experiment evaluated MS medium supplemented with 2,4-D or picloram in different concentrations. In the third chapter, we investigated the effect of osmotic agents, sucrose, sorbitol and mannitol *in vitro* conservation *A. blancheteana*. For the best result micropropagation for multiplication was for medium supplemented with 4.44 μM BA. To induce somatic embryos and regeneration of the concentration of 22.5 μM 2,4-D was the most efficient. Independent of concentration, mannitol was more efficient for *in vitro* conservation of *A. blancheteana* for 12 months.

Keywords: Cytokinin. Growth regulators. Osmotic agent. Growth minimum.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO I - MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Aechmea blancheteana</i> (Baker) L. B. Smith E <i>Aechmea miniata</i> (Beer) Baker	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAIS E MÉTODOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO II - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>Aechmea blancheteana</i> (Baker) L. B. Smith	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAIS E MÉTODOS	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO III - CONSERVAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Aechmea blancheteana</i> (BAKER) L. B. Smith	51
RESUMO	52
ABSTRACT	53
INTRODUÇÃO	54

MATERIAIS E MÉTODOS	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

INTRODUÇÃO GERAL

O território Brasileiro é o mais rico em biodiversidade de todo o Planeta. No Brasil encontram-se 19% de toda a flora mundial. Apenas em plantas superiores, o Brasil possui em torno de 21% das espécies já classificadas no mundo, o que corresponde a aproximadamente 60.000 espécies, sendo que entre essas, 3.557 são endêmicas (GIULIETTI, 2005).

O bioma Mata Atlântica é o que apresenta maior número de espécies ameaçadas ou extintas, com 383 táxons, seguido pelo Cerrado (112), Marinho (92), Campos Sulinos (60), Amazônia (58), Caatinga (43) e Pantanal (30). Isso significa que, em conjunto, Mata Atlântica e Cerrado respondem por mais de 78% das espécies da lista, ou seja, 495 táxons (SALATI, et. al, 2006).

No Brasil, as famílias que apresentam um maior número de espécies são, Orchidaceae, Poaceae, Bromeliaceae, Eriocaulaceae, Araceae, Velloziaceae, Xyridaceae, Arecaceae, Dioscoreaceae e Marantaceae. As Bromeliaceae são na sua grande maioria neotropicais e apresentam uma grande distribuição no Brasil, ocorrendo como epífitas nas florestas ou como plantas terrestres em áreas abertas (GIULIETTI, 2005).

A Mata Atlântica é considerada um dos centros de diversidade da família Bromeliaceae, mais específica na região da costa leste do Brasil e do escudo das Guianas. Uma característica marcante desta família é o endemismo, alguns gêneros e espécies são encontrados exclusivamente neste ecossistema, além disso, muitas vezes podem estar limitados a áreas extremamente reduzidas. Na América do Sul encontra-se a maior diversidade da família Bromeliaceae, com cerca de 40% das espécies e 73% dos gêneros ocorrendo no Brasil. (NUNES, 2002).

A família Bromeliaceae é composta por 58 gêneros e aproximadamente 3172 espécies e subespécies (LUTHER, 2008). Com exceção da espécie *Pitcairnia feliciana*, que habita a costa ocidental da África, todas as demais espécies são nativas do Continente Americano. A família Bromeliaceae está subdividida em três subfamílias: Pitcairnioidae, Bromelioideae e Tillandsioidae, baseando-se em análises comparativas entre as estruturas reprodutivas (REITZ, 1983).

As duas espécies estudadas neste trabalho pertencem à subfamília Bromelioideae, a qual inclui 29 gêneros com cerca de 760 espécies, e são concentradas principalmente na Mata Atlântica. (BENZING, 2000). Esta subfamília é caracterizada por abrigar espécies com hábito epífita, terrestre ou rupícola, com folhas de margens aculeadas; ovário ínfero; óvulos obtusos a caudados; frutos do tipo baga e sementes lisas, sem apêndices (PAULA, 2005).

O gênero *Aechmea* é o maior e um dos mais complexos gêneros da família Bromeliaceae, pertence à subfamília Bromelioideae e reúne cerca de 240 espécies, agrupadas em oito subgêneros (PAULA; SILVA, 2004). O gênero *Aechmea* é restrito ao Novo Mundo, com concentração de espécies no Brasil. Este gênero é caracterizado por apresentar rosetas foliares abertas com cisterna, folhas com espinhos, inflorescência vistosa com longa durabilidade, flores com sépalas, ovário ínfero, fruto do tipo baga, vivamente colorido e persistente na infrutescência.

Segundo MARTINELLI et al, (2008) algumas espécies de Bromeliaceae presentes no Bioma Mata Atlântica necessitam de maior atenção, entre elas encontram-se a *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia* e *Aechmea distichantha* Leme. var. *distichantha*, vulneráveis a extinção, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catinae*, criticamente ameaçada de extinção.

A espécie mais difundida deste gênero é a *Aechmea miniata*, introduzida na Europa em 1826, hoje é encontrada em vários países. *Aechmea blancheteana* e *Aechmea miniata* (Figura1), são espécies terrestres, nativas do Brasil, podem ser cultivadas de forma isolada ou em grupos formando maciços densos, a pleno sol ou a meia-sombra, em canteiros ricos em matéria orgânica, podendo eventualmente ser cultivadas em vasos. São plantas herbáceas perenes, rizomatosas, robustas, de 60 a 90 cm de comprimento, com folhagem e inflorescências decorativas, com folhagens dispostas na forma de roseta, formando tanques (LORENZI; MELLO-FILHO, 2001). São espécies amplamente utilizadas no paisagismo, adaptadas a todas as regiões do Brasil e vêm sendo extraída de seu ambiente natural para atender a demanda do mercado de plantas ornamentais (LORENZI; SOUZA, 1998).



Melo (2008).

Figura 1. Plantas adultas de *Aechmea miniata* (A) e *Aechmea blanchetiana* (B).

O extrativismo tem levado a pesquisas que visam o desenvolvimento de meios de propagação e conservação das espécies nativas e principalmente de espécies ameaçadas de extinção. Visando reduzir o extrativismo e atender a carente demanda do mercado de plantas ornamentais, a produção de mudas é a alternativa mais viável, com isto, evitando a erosão destes germoplasma.

A propagação das bromélias pode ser tanto pela via sexuada quanto pela assexuada, na sexuada a propagação se dá através de sementes, porém, esta via proporciona uma grande variabilidade genética, gerando uma desuniformidade dos indivíduos, o que economicamente não é desejável, além disso, a maturação das sementes pode levar até um ano após a polinização, dependendo da espécie (PAULA, 2005). Já a propagação sexuada através de rebentos laterais demanda tempo para a obtenção de mudas, pois o número de brotações formadas a partir da planta matriz é bastante limitado (KOH e DAVIES, 2001).

A cultura de tecidos surge como uma alternativa para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, e para propagação de espécies de interesse econômico (PING-LUNG et al., 2010). Esta técnica oferece várias vantagens, como a produção em grande escala de plantas em curto período de tempo, além de plantas livres de vírus e bactérias (MERCIER e NIEVOLA, 2003).

Para bromeliáceas, são encontrados diversos protocolos de micropropagação, *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).

O desenvolvimento de protocolos de micropropagação *in vitro* pode ser aplicado para a produção em grande escala compõem estratégias importantes em bromélia, porém, diferenças nos protocolos de multiplicação estabelecidos para diferentes espécies, dependem de fatores como, tipo de explante, idade do explante e principalmente espécie de interesse (DAL VESCO, 2010).

As respostas morfogênicas *in vitro*, como as observadas em bromeliáceas, apresentam características diferenciadas dos sistemas regenerativos tradicionais (GUERRA; DAL VESCO, 2010). Assim, as rotas regenerativas *in vitro* a partir de diferentes fontes de explantes podem ser associadas com a organogênese (MERCIER; KERBAUY, 1992), embriogênese somática (POMPELLI, 2005).

Outra ferramenta da cultura de tecidos é a conservação de germoplasma *in vitro*, que tem como objetivo reduzir ou até suprimir o crescimento das células e tecidos, diminuindo drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade (WITHERS; WILLIAMS, 1998). Esta técnica permite a conservação de germoplasma na forma de embriões, sementes, explantes e indivíduos. A conservação *in vitro* permite a manutenção de germoplasma em um espaço físico reduzido se comparado à conservação em campo e permite manutenção do material vegetal livre de patógenos.

Assim, tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de alternativas para a propagação dos táxons em estudo, as técnicas de cultura de tecidos podem auxiliar neste processo, já que oferecem uma ferramenta viável para obtenção de grande quantidade de plantas, possibilitando ainda, a conservação das espécies em bancos de germoplasma, o que garante a manutenção da biodiversidade deste recurso genético.

Dessa forma, tanto os procedimentos de micropropagação como conservação *in vitro* são importantes na preservação de bromeliáceas, além de possibilitar o estudo da biologia da espécie em estudo.

REFERÊNCIAS

ALVES, G.M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulture** v.110, p. 204–207, 2006

ANDRADE-LIMA, D.. Vegetação IN: **Atlas Nacional do Brasil, I**, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 1966. 1p.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2000, 690p.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. SNDA/DNDV/CLAV, 35 p. 1992.

COFFANI-NUNES, J. V. **Estudos florísticos e fenomorfológicos de Tillandsioideae (Bromeliaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais**. 129 p. Dissertação (Mestrado em Taxonomia Vegetal), USP, São Paulo. 1997.

DAL VESCO, L. L. **Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da Mata Atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): Bases para a conservação e propagação massal**. 2010 (Tese Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Santa Catarina. Brasil. 2010.

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

GIULIETTI, A. M. et. al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

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

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience** v.15, p. 603-604. 1980.

KOH, Y. C.; DAVIES, F. T. J. Mutagenesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 87, p. 225-240. 2001.

LEME, E. M. **Canistrum, Bromélias da Mata Atlântica**. Salamandra, 1996.107p.

LORENZI, H. & Mello-Filho, L.E. 2001. **As plantas tropicais de R. Burle Max**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa.

LORENZI, H. & Souza, H.M. 1998. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**: Plantarum, Nova Odessa.

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

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell Tissue Org. Cult.**, v.30, p.247-249, 1992.

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

MELO, T. B. de. As bromélias no paisagismo. **Bromélia**, n. 1, v. 3, p. 3-7, 1996.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 68f. (Dissertação Mestrado) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2008.

MOREIRA, M. J. S. et. al. Germinação de sementes *in vitro* de espécies de bromélias ameaçadas de extinção. **Magistra**, v. 20, n. 4, p. 321-327. 2008.

PAULA, C. C. **Cultivo de Bromélias**. ed. Editora UFV, v. 26, n.227, p. 73-84, 2005.

PAULA, C. C. SILVA, H. M. P. **Cultivo Prático de Bromélias**. 3. ed. Editora UFV, 2004. v. 1. 106p .

PING-LUNG, H.; ZIN-HUANG, L.; LI-JEN L.; CHI-CHU, T. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell Tiss Organ Culture**. V-105: p. 73-78, 2010.

POMPELLI, M. F., FERNANDES, D.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (*Bromeliaceae*) - An endangered bromeliad from South Brazil. **Propagation of Ornamental Plants**, v.5, n.7, p.192-98, 2005.

RABELO, J. A. 1999. Disponível em: <http://www.jardimdeflores.com.br/> Acesso em 02/11/11.

RECH FILHO, A. et. al. 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** v.14, n.8, p.1799–1808, 2005.

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

RIZZINI, C.T. Tratado **de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Âmbito Cultural Edições Ltda. 1997. 747p.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVES, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p. 697-714. 1991.

ROCHA, C. F. D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; ALMEIDA, D. R.; FREITAS, A. F. N. Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. **Bromelia**, v. 4, n.1, p. 7-10. 1997.

SALATI, E. et. al. Temas ambientais relevantes. **Estudos avançados**, Abr 2006, v. 20, n. 56, p.107-127, 1997.

SARASAN, V. et. al. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 42: 206-214, 2006.

SILVEIRA, D. G. **Micropropagação e variabilidade genética de populações naturais de caroá** [*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez]. 2009. (Tese Doutorado). Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana. Brasil. 2009.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). L.B. Smith & R.J. Downs (eds.). **Flora Neotropica**. v. 3 p. 1493-2142, 1979.

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

TAVARES, S. et. al. **Inventário florestal de Alagoas**. III. Estudo preliminar da Mata do Varrela, município Barra de São Miguel. Relatório Técnico 3. Departamento de Recursos Naturais - SUDENE- Recife. 1969.

WITHERS, L. A; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES et al. [ed.]. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA, v.1, p.297-330. 1998.

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO DE *Aechmea miniata* (Beer) Baker E *Aechmea blancheteana* (Baker) L. B. Smith

RESUMO

A técnica de micropropagação permite disponibilizar para a indústria agrícola uma grande quantidade de mudas sadias e com características homogêneas, independente da estação do ano. O presente trabalho teve o objetivo de estabelecer os protocolos de micropropagação de *A. miniata* e *A. blancheteana*, para tanto, foram realizados experimentos de germinação, multiplicação, enraizamento e aclimatização. No primeiro experimento sementes foram inoculados em meio MS e posteriormente avaliada a germinação. No segundo experimento, explantes caulinares foram inoculados em meio MS suplementado com 0,00; 4,44; 8,88 ou 13,32 μM de BAP foram avaliados número de brotos/explante, comprimento das brotações, número de raízes, comprimento das raízes. No terceiro experimento brotos foram inoculados em meio MS com metade da concentração salina ($\text{MS}_{1/2}$), suplementado com 0, 1, 2 e 3 μM AIB ou ANA, após 60 dias foram avaliadas a porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento da maior raiz, e em seguida estes brotos foram aclimatizados e avaliada a taxa de sobrevivência. Os resultados mostraram que é possível se obter uma taxa acima de 90% de germinação para as duas espécies. Para a multiplicação de *A. miniata* e *A. blancheteana* a concentração 4,44 μM de BAP mostrou maior eficiência para as duas espécies. Foi observado que a taxa de sobrevivência de plantas de *A. blancheteana*, apresentou menor valor para as plantas oriundas do meio sem auxina, (81%), não havendo diferença estatística entre os demais tratamentos, e para *A. miniata*, a taxa de sobrevivência foi próxima a 100%, não sendo necessária a realização da etapa de enraizamento.

Palavras chave: Multiplicação. Citocinina. Enraizamento. Aclimatização. Auxinas.

ABSTRACT

The micropropagation technique allows for the farming industry providing a large amount of healthy seedlings and with homogeneous characteristics, regardless of the season. This study aimed to establish protocols for micropropagation of *Aechmea miniata*, and *A. blancheteana*, therefore, experiments were performed germination, multiplication, rooting and acclimatization. In the first experiment seeds were inoculated on MS medium and subsequently tested for germination. In the second experiment, the stem explants were inoculated on MS medium supplemented with 0.00, 4.44, 8.88 or 13.32 μM BAP were evaluated number of shoots / explant, shoot length, number of roots, length of roots. In the third experiment shoots were cultured on MS medium with half the salt concentration ($\frac{1}{2}$ MS) supplemented with 0, 1, 2 and 3 μM IBA or NAA after 60 days were evaluated rooting percentage, root number and length of the longest root, then these shoots and plantlets were evaluated the survival rate. The results show that it is possible to obtain a rate above 90% germination of both species. For multiplication *A. miniata* and *A. blancheteana* concentration 4.44 μM BAP showed higher efficiency for both species. It was observed that the survival rate of plants of *A. blancheteana* showed lower value for the plants from the medium without auxin (81%), with no statistical difference between the other treatments, and *A. miniata*, the survival rate was close to 100%, it is not necessary to perform the step of rooting.

Keywords: Multiplication. Cytokinin. Rooting. Acclimatization. Auxins.

1. INTRODUÇÃO

A floresta tropical atlântica é um bioma de alta biodiversidade e endemismo, estimando-se a presença de 20.000 espécies de plantas, das quais 8.000 (40%) são endêmicas (MYERS et al., 2000). Entre os componentes de grande importância ecológica e econômica deste bioma encontram-se as bromélias, as quais, pela fragmentação deste ecossistema e em função de seu valor ornamental foram, ao longo do tempo, extraídas desordenadamente de seus habitats naturais (DAL VESCO, 2010), fato este que pode contribuir para a extinção de espécies.

A. blancheteana e *A. miniata*, são espécies terrestres, nativas do Brasil, podem ser cultivadas de forma isolada ou em grupos formando maciços densos, a pleno sol ou a meia-sombra, em canteiros ricos em matéria orgânica, podendo eventualmente ser cultivadas em vasos e são plantas herbáceas perenes, rizomatosas, robustas, de 60 a 90 cm de comprimento, com folhagem e inflorescências decorativas, com folhagens dispostas na forma de roseta, formando tanques (LORENZI; MELLO-FILHO, 2001). São espécies amplamente utilizadas no paisagismo, adaptadas a todas as regiões do Brasil e vêm sendo extraída de seu ambiente natural para atender a demanda do mercado de plantas ornamentais (LORENZI; SOUZA, 1998).

A falta de um sistema de produção para atender o mercado de plantas ornamentais, aliada à coleta indiscriminada por moradores locais, para a comercialização dessas plantas, vem ampliando desta forma a pressão extrativista, e colocando várias espécies na condição de ameaçadas (ANACLETO, 2001).

A propagação de bromélias é lenta, e após a floração a planta matriz emite geralmente apenas um broto lateral (HOSOKI; ASAHIRA, 1980). Em vista disso, a produção de mudas para atender a crescente demanda de mercado seria uma estratégia para tentar reduzir o extrativismo predatório (SILVEIRA et al., 2009).

Em vista disso, a técnica de micropropagação surge como uma alternativa para atender o mercado de plantas ornamentais, disponibilizando uma grande quantidade de mudas sadias, livres de agentes fitopatogênicos e com características uniformes (CARNEIRO; MANSUR, 2004; DROSTE et al., 2005)

Métodos de cultivo *in vitro* têm sido aplicados na conservação e multiplicação de genótipos específicos de bromélias (LIMA et al., 2012). Porém esta técnica depende da produção de protocolos eficientes, pois segundo Guerra; Dal Vesco, (2010) as respostas morfogênicas *in vitro* como as observadas em bromeliáceas apresentam características diferenciadas aos sistemas regenerativos tradicionais e a variabilidade da resposta morfogênica existe até entre genótipos da mesma espécie.

No estabelecimento de um sistema de micropropagação adequado, são necessários estudos que garantam ajustes em todas as etapas, germinação, multiplicação e principalmente na aclimatização. Entre os fatores que influenciam a eficiência de um protocolo de propagação, o meio de cultivo está entre os mais relevantes, destacando-se os reguladores vegetais, substâncias determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS et al., 1998).

Dentre os reguladores vegetais, as auxinas e as citocininas são empregadas largamente nesta técnica. As auxinas estão envolvidas na regulação de vários processos fisiológicos, como dominância apical, formação de raízes, dentre outros, sendo essencial para os processos de divisão e diferenciação celular. Já as citocininas são importantes na indução de brotações laterais, mobilização de nutrientes e juntamente com auxina atuam na morfogênese *in vitro*.

Em *A. blancheteana*, Galvanese et al., (2007), avaliando diferentes concentrações de BAP e ANA em meio líquido, obtiveram uma taxa de multiplicação média de 26,84 brotos por segmento caulinar, porém foi observado o aparecimento de calos, após quatro meses de cultivo.

Moreira et. al., (2009), avaliando a multiplicação *in vitro* de *A. miniata*, obtiveram uma taxa média de 6,6 brotos, utilizando segmento caulinar como fonte de explante, e verificaram que em concentrações acima de 22,2 μM BAP de BAP ou PBZ ocorreu a diminuição da taxa de multiplicação e também presença de calos e plantas anormais.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer os protocolos de micropropagação e conservação *in vitro* de *A. miniata* e *A. blancheteana*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização dos experimentos

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agropecuário (EBDA).

2.2. Condições de cultivo

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

2.3. Germinação *in vitro* de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana*

Sementes de *A. blancheteana* e *A. miniata* foram retiradas de frutos maduros e colocadas para secar sobre papel filtro durante três dias a temperatura ambiente. Sementes secas foram desinfestadas em álcool 70% durante um minuto e hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo por 15 minutos e posteriormente foram lavadas em água destilada autoclavada duas vezes e inoculadas em frascos de vidro (100 x 70 mm) contendo 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30gL^{-1} de sacarose e 7gL^{-1} de ágar, e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

A cada dois dias foi avaliado o número de sementes germinadas de *A. miniata* e *A. blancheteana* até que este se tornasse constante. Considerou-se como germinada, as sementes que emitiram a radícula. Após 50 dias de incubação, foi determinada a porcentagem total de germinação. Para cada espécie foram utilizadas 4 repetições, sendo que cada repetição constou de um frasco contendo 50 sementes.

2.4. Multiplicação de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana*

Explantes caulinares com aproximadamente 5mm de comprimento, das plântulas germinadas *in vitro* foram incubados em tubos de ensaio (25x150 mm) com 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30gL^{-1}

de sacacore e 7gL^{-1} de ágar, acrescido de 0,00; 4,44; 8,88 ou $13,32\ \mu\text{M}$ de benzilaminopurina (BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 15 minutos. Foram realizadas cinco repicagens em intervalos de 45 dias, totalizando de 225 dias de cultivo. A cada repicagem foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos/explante, comprimento das brotações (cm), número de raízes, comprimento das raízes (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas espécies e quatro concentrações de BAP. Cada tratamento foi composto por 40 repetições. A unidade experimental constituiu-se de 1 explante por tubo de ensaio.

2.5. Enraizamento de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana*

Brotos micropropagados de *A. miniata* e *A. blancheteana* e com aproximadamente 5mm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) com 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração salina ($\text{MS}\frac{1}{2}$), suplementado com 0, 1, 2 e $3\ \mu\text{M}$ de ácido indolbutírico (AIB) ou ácido naftalenoacético (ANA). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 15 minutos.

Após 60 dias foram analisados a porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento da maior raiz. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo dois tipos de auxina e quatro concentrações de cada auxina. Cada tratamento foi composto por 40 repetições. A unidade experimental constituiu-se de 1 explante por tubo de ensaio.

2.6. Aclimatização de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana*

Para este experimento, o delineamento foi o mesmo utilizado na etapa de enraizamento, sendo 2 tipos de auxina, 3 concentrações e mais 1 tratamento controle, totalizando 7 tratamentos.

Brotos de *A. miniata* e *A. blancheteana* oriundos da etapa de enraizamento foram removidos das condições *in vitro* e tiveram suas raízes

lavadas com água destilada para a remoção dos resíduos do meio de cultura. Os brotos enraizados foram transferidos para bandejas de polipropileno de 200 células, com dimensões de 5x5x9cm, contendo substrato plantmax hortaliças HT[®], permanecendo em casa de vegetação com interceptação luminosa de 50%, sendo que nos primeiros 20 dias as bandejas ficaram cobertas com polietileno transparente (150 µm).

A irrigação das plantas foi feita por meio de aspersor manual, com vazão média de 60 L/H/m² durante 2 minutos. Nos primeiros 20 dias as mudas foram submetidas a duas irrigações diárias com intervalo de 8 horas entre cada irrigação, sendo mantida apenas uma irrigação a partir do 21^o dia.

2.7. Análise estatística

Foram realizadas análise de variância e análise de regressão. A comparação de médias foi realizada com o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Para homogeneizar a variância, fez-se a transformação de dados usando a fórmula $\sqrt{v + 0.5}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Germinação *in vitro* de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana*

Sementes de *A. miniata* e *A. blancheteana* apresentaram contaminação total de 13,6%, e 11,2%, respectivamente (Tabela 1). Apesar de ter ocorrido contaminação, o protocolo de desinfestação foi eficiente para as duas espécies, pois os resultados apresentados são semelhantes aos estudos com a maioria das espécies, demonstrando que não há maiores problemas para a desinfestação das sementes (GALVANESI et al. 2007; SANTOS, 2009).

O início da germinação para *A. miniata* e *A. blancheteana* ocorreu aos 8^o e 12^o dias após a semeadura, respectivamente; estendeu-se até o 40^o dia quando ocorreu a estabilização da germinação, totalizando 97,1% para *A. miniata* e 90,2% para *A. blancheteana* (Figura 1).

Tabela 1. Porcentagem total de germinação e contaminação de sementes de *A. miniata* e *A. blancheteana* após 50 dias de inoculação.

	Espécie	
	<i>A. miniata</i>	<i>A. blancheteana</i>
Germinação total	97,1	90,2
Contaminação bacteriana(%)	3,9	2,7
Contaminação fúngica (%)	9,7	8,5
Contaminação total (%)	13,6	11,2

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que as bromeliáceas são facilmente propagadas por sementes e corroboram com diversos autores que relatam altas taxas de germinação para as bromélias; Menescal (1994) e Miranda (1998) obtiveram em torno de 100% de germinação para *Aechmea tocutina*; já Pinheiro et.al. (2003) trabalhando com *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Schultes F.) obteve 90% de germinação; em *Tillandsia eizii*, Pickens et al. (2003) obtiveram 86,7% de germinação, e com *Neoglaziovia variegata*, Silveira et al. (2009), avaliando diferentes meios de cultura, obtiveram cerca de 90% de germinação.

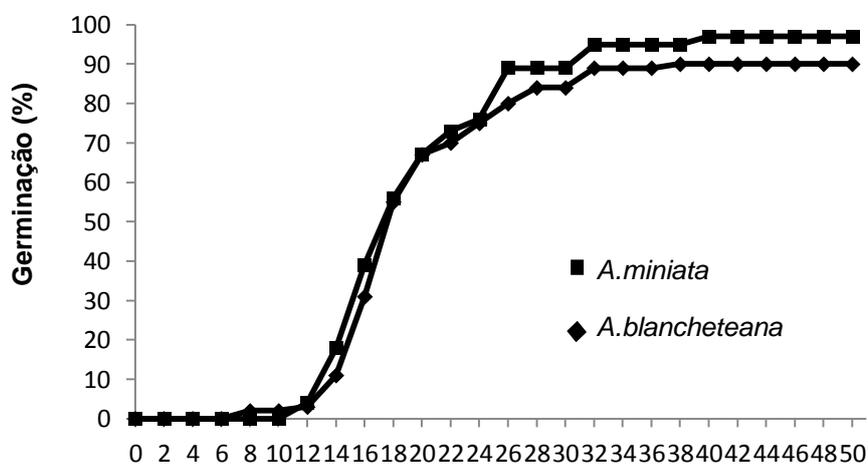


Figura 1. Comportamento germinativo das sementes de *A. miniata* e *A. blancheteana* ao longo de 50 dias.

3.2. Multiplicação *in vitro* de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana*

Para as duas espécies foram observadas a formação de brotos em todos os tratamentos. No entanto, houve diferença no número médio de brotos para as duas espécies em função das concentrações de citocinina estudadas (Tabela 2).

Dentre as duas espécies, observa-se que não houve diferença estatística significativa para o número de brotações por explante, com média de 8,1 para *A. miniata* e 6,8 para *A. blancheteana* (Tabela 2). Estes resultados sugerem um comportamento crescente para o número de brotos para as duas espécies.

Tabela 2. Número médio de brotações por explante em diferentes concentrações de BAP após 225 dias, em duas espécies de Bromeliaceae.

Espécies	BAP (μM)				Média
	0,00	4,44	8,88	13,32	
<i>A. miniata</i>	1,09dA	6,77cA	10,03bA	14,48aA	8,10A
<i>A. blancheteana</i>	1,11cA	6,11bA	9,39aA	10,49aB	6,80A
Média	1,10d	6,44c	9,71b	12,48a	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Resultados superiores aos observados para *A. blancheteana* foram reportados para a mesma espécie por Galvanese et al, (2007) que com a combinação de 26,63 μM de BAP com 0,36 μM de ANA, proporcionou um número médio de 62 brotações utilizando segmento caulinar como fonte de explante, porém, este autor relatou uma alta frequência de plantas anormais para os tratamentos com concentrações mais elevadas. Entretanto, diversos trabalhos com micropropagação de bromélias obtiveram resultados inferiores aos reportados neste estudo; Carvalho et al, (2009) em pesquisas com esta mesma espécie, obtiveram 3,75 brotos/explante quando foi utilizado 13,32 μM de BAP; para *A. bromeliifolia* (5,37 brotações por explante), *A. distichantha* (7,27 brotações por explante) e *A. multiflora* (3,99 brotações por explante) após 225 dias de cultivo (ROCHA, 2010).

Apesar da concentração 13,32 μM de BAP ter proporcionado o maior número médio de brotos por explante, estes apresentaram características anormais morfológicamente, como, brotos pequenos sem raiz e/ou em pequena quantidade e pouco desenvolvidas, estas características também foram observadas para a concentração, 8,88 μM de BAP (Figura 2). De acordo com Guevara et al, (1987), existe uma concentração máxima para que se tenha uma resposta satisfatória, para que se obtenha brotos normais, acima da qual há um efeito inibitório. Segundo Rech Filho et al, (2005) este comportamento provavelmente, pode estar relacionado com a fitotoxidez causada pelo regulador

de crescimento. Este resultado sugere que sejam utilizadas concentrações menores de regulador vegetal. Portanto, para se obter o maior número de brotos viáveis por explante a concentração 4,44 μ M de BAP é a mais indicada.

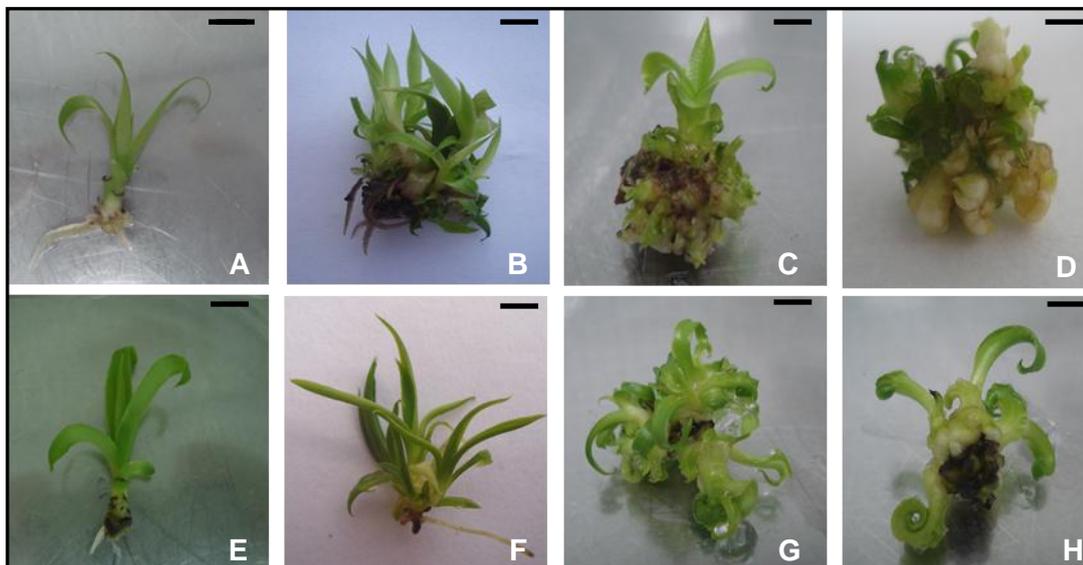


Figura 2. Brotações de *Aechmea miniata* cultivadas em meio MS com 0,00 (A), 4,44 (B), 8,88 (C) e 13,32 μ M de BAP(D). Brotações de *Aechmea blancheteana* cultivadas em meio MS suplementado com suplementado com 0,00 (E), 4,44 (F), 8,88 (G) e 13,32 μ M de BAP(H) (barra: 0,5 cm).

Silveira et al. (2009) ao realizar experimentos de micropropagação de caroá (*Neoglaziovia variegata*) também verificaram este mesmo comportamento com BAP e CIN nas concentrações 2,22 e 4,44 μ M. De forma similar, Rocha (2010) obteve indução de maior número de brotações por explante com 8,88 μ M de BAP, para *A. bromeliifolia*, *A. distichantha* e *A. multiflora*, porém, estas se apresentam unidas entre si, dificultando o processo de individualização.

Macêdo et al., (2003), sugerem que tratamentos em concentrações menores de BAP são os mais indicados devido à maior facilidade de individualização dos brotos. Embora, Silva et al. (2002) tenham observado que a aplicação de BAP até a concentração máxima de 11,08 μ M ao meio de cultura para a multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro aumentou o número total de brotos viáveis.

Para a variável comprimento das brotações, independente da espécie, os maiores valores foram observadas no tratamento sem a adição do BAP,

verificando-se um comportamento linear decrescente, pois à medida que se aumentou a concentração de BAP, houve a redução do comprimento das brotações (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do BAP comprimento médio das brotações de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana* ao final de 225 dias de cultivo.

Espécies	BAP (μM)				Média
	0,00	4,44	8,88	13,32	
<i>A. miniata</i>	1,90a	1,30a	0,90b	0,7b	1,20A
<i>A. blancheteana</i>	1,60a	1,10ab	0,8b	0,6b	1,02A
Média	1,75a	1,20ab	0,85b	0,65c	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram observados por diversos autores como Moreira (2001) em abacaxizeiro cv. Pérola; Macêdo et al. (2003) em *Ananas comosus*; Pasqual et al., (2008) em abacaxizeiro ornamental; Fráguas et al., (2009) com a cultivar 'IAC Gomo-de-mel' e Nonato et al. (2009) em *Ananas erectifolius*. Silveira et al., (2009) também observaram resultado similar para *Neoglaziovia variegata*, quando foi adicionado BAP ao meio de cultura, promoveu maior número de brotações, entretanto os brotos eram pequenos e com poucas raízes formadas. O mesmo resultado foi relatado por Almeida et al. (2002) em *Ananas comosus* (L.) Merrill, que verificam a diminuição do número ou a ausência total de brotações para concentrações maiores que 6,66 μM de BAP.

Para o comprimento de raízes, foi observada a redução na formação de raízes quando foi adicionado BAP, e para as concentrações maiores que 4,44 μM esta redução foi ainda mais drástica, independente da espécie avaliada (Tabela 4). Este dado revela a forte ação do BAP na indução das brotações laterais e um balanço auxina/citocinina insuficiente para promover a formação satisfatória de raízes juntamente com a formação de brotos.

Ben-Jaacov et al., (1991) afirmam que fatos como estes confirmam a teoria de que as citocininas inibem ou atrasam a formação de raízes. Silva et al., (2002) obtiveram resultados semelhantes em *Ananas comosus* (L.) Merrill e *Aechmea bambusoide*, quando ao estudarem a influência do BAP na proliferação *in vitro* dessas espécies, verificaram que o aumento nas concentrações desse

regulador ocasionou redução no número de raízes. Contudo, há necessidade de outros estudos para confirmar esses resultados que sugerem que tratamentos com concentrações ainda menores de BAP podem ser mais indicados.

Muitos estudos têm mostrado que as citocininas controlam vários aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo: divisão celular, retardamento da senescência de folhas, através da mobilização de nutrientes, dominância apical, quebra de dormência de gemas e desenvolvimento de flores. Dentre estes, o controle da divisão celular é de considerável significância para o crescimento e desenvolvimento da planta e foi graças a este efeito que se identificou esta classe de regulador.

Tabela 4. Efeito do BAP no número e comprimento médio de raízes de *A. miniata* e *A. blancheteana* ao final 225 dias de cultivo.

Variáveis analisadas	BAP (μM)	Espécies		Média
		<i>A. miniata</i>	<i>A. blancheteana</i>	
Número de raízes	0,00	2,10aA	2,22Aa	2,16A
	4,44	0,82bB	0,73Bb	0,78B
	8,88	0,21cC	0,19cC	0,20C
	13,32	0,07dC	0,00Dc	0,04D
Comprimento de raízes (cm)	0,00	1,93aA	1,57aA	1,75A
	4,44	0,67bB	0,46bB	0,57B
	8,88	0,09cC	0,08cC	0,09C
	13,32	0,00dC	0,00cC	0,00D

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.3. Enraizamento

Os brotos de *A. miniata* e *A. blancheteana* produzidos em diferentes concentrações de ANA e AIB apresentaram 100% de enraizamento (Tabela 5).

Estes resultados corroboram os resultados encontrados por Girija et al. (1999) que verificaram 100% de enraizamento em gemas de *crossandra infundibuliformis* em meio MS com 4,92 μM de AIB e com Barboza et al. (2004), cujos estudos demonstraram que tratamentos sem reguladores promoveram a rizogênese *in vitro* em 100% dos brotos de abacaxizeiro do híbrido PExSC-52.

Verifica-se que o enraizamento ocorre independente da suplementação com auxina, entretanto, para as duas espécies, a adição desse regulador vegetal

influenciou somente o número de raízes, não havendo diferença estatística para o comprimento de raízes (Tabela 4). Este comportamento também foi verificado por Dias et al. (2010) que trabalhando com *Ananas comosus* var. *erectifolius*, e por Carvalho, (2010) em *A. comosus* var. *ananassoides*.

Tabela 5. Efeito de diferentes concentrações de ANA ou AIB sobre a porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes (cm), em explantes de *A. miniata* e *A. blancheteana*.

<i>Aechmea miniata</i>					
Trat.	ANA (μ M)	AIB (μ M)	Enraizamento (%)	Nº raízes	Comp. raízes (cm)
1	0	0	100a	3,45d	3,07a
2	1	0	100a	3,27d	3,67a
3	2	0	100a	4,10bc	3,55a
4	3	0	100a	4,75a	3,61a
5	0	1	100a	3,75cd	3,28a
6	0	2	100a	3,67cd	3,42a
7	0	3	100a	4,35ab	3,49a
CV (%)				31.64	48.52
<i>Aechmea blancheteana</i>					
Trat.	ANA (μ M)	AIB (μ M)	Enraizamento (%)	Nº raízes	Comp. raízes (cm)
1	0	0	100a	1,82e	2,05b
2	1	0	100a	2,70d	3,49a
3	2	0	100a	3,95ab	2,89a
4	3	0	100a	4,35a	2,96a
5	0	1	100a	3,00cd	2,97a
6	0	2	100a	3,50bc	3,08a
7	0	3	100a	4,25a	3,45a
CV (%)				31.16	41.41

Valores seguidos pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Segundo Anderson (1984), diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam facilmente *in vitro* sob baixas concentrações de auxina ou, simplesmente, em meio básico sem regulador vegetal.

Com exceção do tratamento controle, sem adição de auxina, o número de raízes e o comprimento das raízes formadas em explantes de *A. blancheteana* aumentou independentemente do tipo de auxina adicionada (Tabela 4). Sendo verificado maior número de raízes formadas nos tratamentos com 3 μ M de ANA e AIB, com 4,35 e 4,25 raízes por explante respectivamente.

O mesmo comportamento foi observado para *A. miniata*, ao suplementar o meio de cultura com 3,0 μM de ANA ou AIB, apresentando respectivamente, 4,75 e 4,35 raízes por explante (Tabela 4).

Resultados diferentes aos obtidos foram reportados por Hewawasam et al. (2001), ao observar que as brotações de *Crossandra infundibuliformis*, apresentaram a maior quantidade de explantes enraizados em meio de cultura MS sem regulador de crescimento. De acordo com Grattapaglia e Machado (1990) e Pio et al. (2002), a adição de uma auxina ao meio de cultivo beneficia o processo de indução de raízes.

3.4. Aclimatização

Após 60 dias de transferência da condição *in vitro* para a casa de vegetação, foi verificado que para *A. miniata* não é necessário a utilização de auxina, pois não houve diferença estatística para o percentual de sobrevivência entre os tratamentos estudados durante o processo de enraizamento (Tabela 6).

Houve diferença estatística significativa para sobrevivência das brotações de *A. blancheteana* entres tratamentos avaliados, porém, não houve diferença entre os tratamentos com adição de auxina, sendo superior ao tratamento isento de regulador, provavelmente este resultado se deu em função deste tratamento ter apresentado menor número e comprimento de raízes.

Tabela 6. Valores de sobrevivência de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana* após 60 dias de transferência para casa de vegetação, em função de diferentes concentrações de ANA e AIB.

Auxina	Concentração (μM)	Sobrevivência (%)	
		<i>A. miniata</i>	<i>A. blancheteana</i>
ANA	0	95a	81b
	1	98a	91a
	2	100a	93a
	3	100a	96a
AIB	1	100a	93a
	2	96a	95a
	3	94a	100a

Valores seguidos pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nas condições do presente trabalho, foi verificado que para a aclimatização das duas espécies, não houve grandes complicações, pois os resultados mostram altas taxas de sobrevivência, superiores a 80% indicando que as espécies apresentam rusticidade e que o período de aclimatização não é um fator limitante na micropropagação (Figura 3).

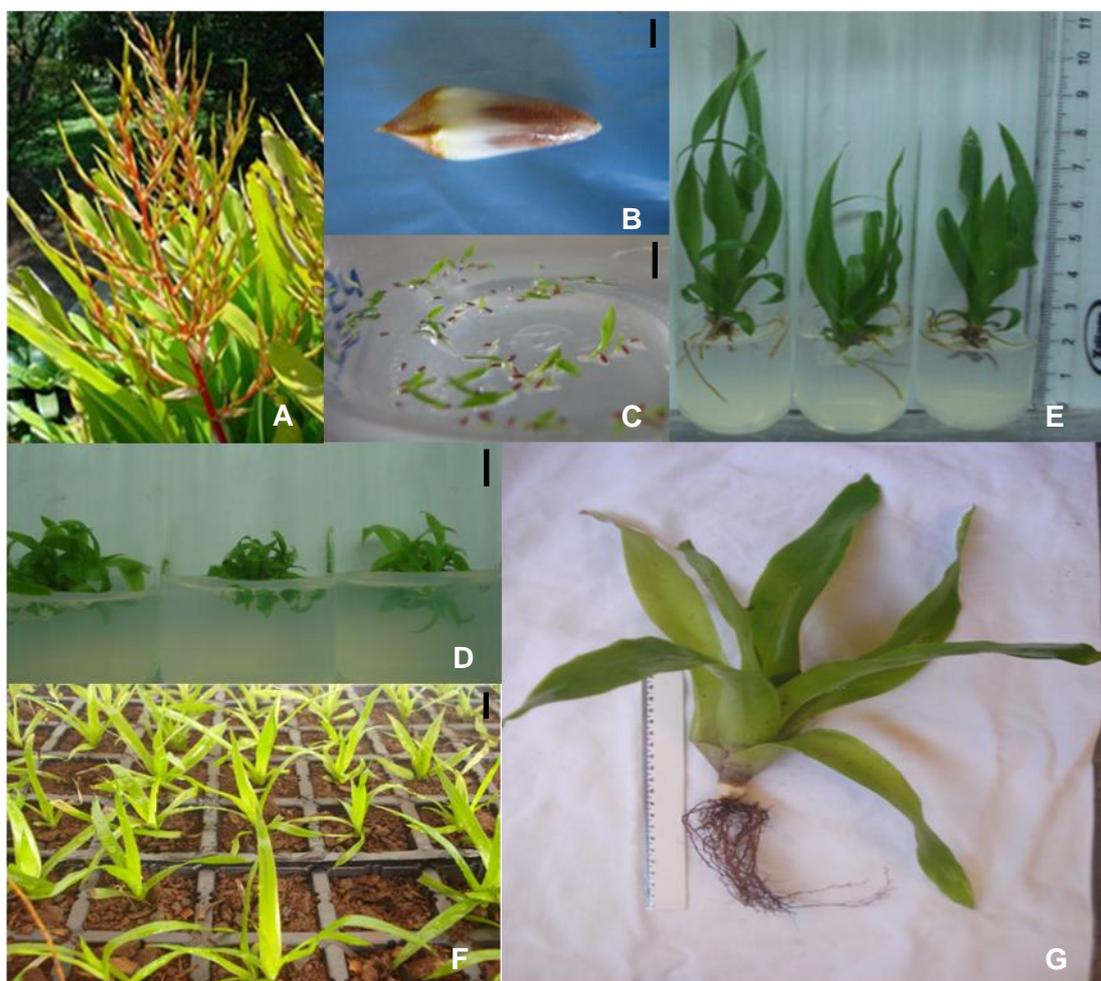


Figura 3. Representação esquemática do protocolo de micropropagação de *Aechmea blancheteana* A. Planta de *A. blancheteana*. B. Fruto com sementes de *A. blancheteana*; C. Sementes germinadas de *A. blancheteana* aos 7 dias; D. Multiplicação dos brotos aos 45 dias; E. Enraizamento de *A. blancheteana*; F. Plântulas recém transplantadas; G. Planta de *Aechmea blancheteana* aclimatizada após 180 dias da transferência para a condição *ex vitro* (barra: 0,5 cm).

4. CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* de sementes de *A. blancheteana* e *A. miniata* em meio MS se mostrou eficiente para as duas espécies;

Para a multiplicação *in vitro* *A. blancheteana* e *A. miniata* a partir de segmentos caulinares a concentração de 4,44 μ M de BAP é a mais recomendada;

As duas espécies estudadas apresentaram 100% de enraizamento em meio isento de regulador;

Altas taxas de sobrevivência na aclimatização indicam que a micropropagação é uma alternativa viável para as duas espécies estudadas;

O uso de auxina no meio favoreceu a aclimatização de *A. blancheteana*.

5.REFERÊNCIAS

ALMEIDA W.A.B; SANTANA G.S; RODRIGUEZ A.P.M; COSTA M.A.P.C. 2002. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, n. 1,24: 296-300

ANACLETO, A. **Bromélias no litoral paranaense, um problema social, um drama ambiental**. Monografia apresentada ao Concurso Nacional Desenvolvimento Sustentável uma realidade possível - NIMAD-UFPR, Curitiba, 2001. 27 p.

ANDERSON, W.C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal American Society Horticulture Science**, v.109, p.343-347, 1984.

BARBOZA, S.B.C.; CALDAS, L.S.; SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.725-733, 2004.

BELLINTANI, M. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthopytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia – Brasil. **Revista Brasileira de Biociencias** v.5, n. 2, p.1101-1103, 2007.

BEN-JAACOV, J.; ACKERMAN, A.; TAL, E.; JACOBS, G. Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. **HortScience**, v.26, n.2, p.74-75, 1991.

CALDAS L. S; BUSO J. A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. p. 87-132. 1998.

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

CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R.F.G; BRITO, C.J.M. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.55, n.4 p.79-83, 1999.

CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS; G. M. G.; MORAIS, J. P. S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.27, n.1, p.103-108, 2009.

CARVALHO, A.C.P.P. de. **Produção *in vitro* de mudas de Abacaxi ornamental**. Acesso em: www.cnpat.embrapa.br. Acesso em: 29 maio. 2013.

DAL VESCO, L. L. **Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da Mata Atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): Bases para a conservação e propagação massal. 2010** (Tese Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Santa Catarina. Brasil. 2010.

DROSTE, A. et. al. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesia philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. **Brazilian Archives of biology and Technology**. v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GALVANESE, 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**. v,54, n.1, p.63-67, 2007.

GIRIJA, S.; GANAPATHI, A.; VEGADESAN, G. Micropropagation of *Crossandra infundibuliformis* (L.)Nees. **Scientia Horticulturae**. v.82, n.1, p.331-337, 1999.

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, v.1, p. 183-260,1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-169.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology. **Humana Press- Springer**, v.589, n.1, p.47-66, 2010.

GUEVARA, E. B. Reguladores de crescimento. In: **II Curso de cultivo de tejidos**. [S.l.]: Turrialba, p. 58-79, 1987.

HEWAWASAM, W.D.C.J.; BANDARA, D.C.;ABEYARATHNE, W.M. *In vitro* propagation of *Crossandra infundibuliformis* var. Danica through shhot tip and callus culture. **Tropical Agricultural Research**, Washington, v.13, p.328-340, 2001

LIMA, C. O. de C. ; MARCHI, M. N. G. ; BRITO, A. L. ; BELLINTANI, M. C. ; SANTANA, J. R. F. de . Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**. v. 42, p. 249-254, 2012.

MACÊDO C.E.C, SILVA M.G., NÓBREGA, F.S., MARTINS, C.P., BARROSO P.A.V Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25:3:501-504, 2003.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA; R. C. Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, v.1, p. 209-258, 2008.

MENESCAL, R. B. Reprodução de bromélias por sementes. **Bromélia**, v. 1, n. 4, p. 8-10,1994.

MIRANDA, Antônio. Em busca da *Aechmea tocontina*. **Bromélia**, v. 5, n. 1-4, p. 47-49, 1998.

MYERS, N.; Mittermeier, R. A.; Fonseca, G. A. B. & Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

MOREIRA M.A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merrill cv. Pérola**. Lavras: UFLA. 81p. . 2001 (Tese doutorado).

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

NONATO, C. V. F.; LAMEIRA, O. A.; SILVA, G. M. Efeito do BAP no subcultivo in vitro de brotos de curauá (*Annanas erectifolius* L. B. Smith). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CPATU-2009>. Acesso em 30 jan. 2012.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**. v. 26, n.1, p.211-216, 2008.

PICKENS, K. A., AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* in vitro. **HortScience** v.38, n. 1, p. 101-104, 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* v.42, n.1, p.348-353, 2006.

PINHEIRO, F.; BORGHETTI, F. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L) Grisebach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Schultes F.) Mez (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 1, p. 27-35, 2003.

PIO, R. et al. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citros Tangerina Sunki x Trifoliata English 63-256 com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.66-70, 2002.

RECH FILHO, A. et. al. 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** v.14, n.1, p.1799–1808. 2005.

ROCHA, M.A.C. **Conservação e multiplicação *in vitro* de espécies de Bromeliaceae ornamentais**. 2010. 103p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

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.

SILVA, A. B.O.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; MOREIRA, M.A.; DUTRA L. F. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.26, n.6, p.1190-1196, 2002.

SILVEIRA, D. G. ; Souza, F. V. D. ; Pelacani, C. ; SOUZA, Antônio da Silva ; LEDO, Carlos Alberto da Silva ; 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**, v. 52, n.1, p. 923-932, 2009

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. v. 1, 864 p.

ZIMMERMAN, R.H. Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.3, n. 1, p.301-311, 1984.

CAPÍTULO II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith

RESUMO

A embriogênese somática consiste no processo de regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro*, em que células somáticas ou haplóides desenvolvem-se em diferentes estádios embriogênicos, formando estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem fusão de gametas. Este trabalho teve como objetivo induzir embriões somáticos utilizando segmento foliar de *Aechmea blanchetiana*, para isto foram realizados dois ensaios, no primeiro foi utilizado meio MS suplementado com 2,4-D ou Picloram nas concentrações 1,25; 2,50; 5,00 e 10,00 μM , e no segundo protocolo, meio MS, suplementado com a auxina 2,4-D nas concentrações, 2,26; 4,53; 9,06; 22,5 μM e a citocinina BAP nas concentrações 0,0; 2,22 e 4,44 μM . As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h, onde permaneceram por 60 dias. Após este período foram analisadas a porcentagem de indução de calos embriogênicos, regeneração e indução de embriões. No primeiro ensaio, o 2,4-D apresentou maior eficiência para a formação de calos embriogênicos quando comparado com o Picloram. As concentrações 5,00 e 10,00 μM de 2,4-D induziram a formação de calos embriogênicos em 38 e 45% dos explantes foliares de *Aechmea blanchetiana* respectivamente. No segundo ensaio foi verificado que os tratamentos com 22,5 μM de 2,4-D e 22,5 μM de 2,4-D combinado com 4,44 μM de BAP induziram maior porcentagem de calos embriogênicos. Para o desenvolvimento de embriões, o tratamento com 22,5 μM de 2,4-D foi o mais eficiente, induzindo a formação de 126,5 embriões ao final de experimento. Para os dois ensaios não foi verificada a conversão de embriões em plântulas.

Palavras chave: Indução. Regeneração. Citocininas. Auxina.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is the process of plant regeneration from *in vitro* experiments in which somatic cells haploid or develop in different stages embryogenesis, forming structures resembling zygotic embryos without gamete fusion. This study aimed to induce somatic embryos using foliar *Aechmea blanchetiana* to two protocols that were studied, the first used was MS medium supplemented with 2,4-D or Picloram concentrations 1.25, 2.50, 5.00 and 10.00 μM , and the second protocol, the MS medium supplemented with the auxin 2,4-D concentrations, 2.26, 4.53, 9.06, and 22.5 μM and BAP concentrations 0.0, 2.22 and 4.44 μM . Cultures were maintained in a growth room at $25 \pm 2^\circ \text{C}$, photon flux density of $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 16 h, where they remained for 60 days. After this period we analyzed the percentage of embryogenic callus induction, regeneration and induction of embryos. In the first test, the 2,4-D was more efficient when compared with Picloram, for embryogenic callus formation. Concentrations 5.00 and 10.00 μM of 2,4-D induced the formation of calli in 38 and 45% of leaf explants *Aechmea blanchetiana* respectively. In the second experiment it was found that treatment with 22.5 μM of 2,4-D and 22.5 μM of 2,4-D combined with 4.44 μM BAP induced the highest percentage of calli. For the development of embryos, treatment with 22.5 μM of 2,4-D was the most effective, 126.5 inducing the formation of embryos at the end of the experiment. For both trials was not observed conversion of embryos into plantlets.

Keywords: Induction. Regeneration. Cytokinin. Auxin.

1. INTRODUÇÃO

Em bromélias, estratégias baseadas nas técnicas de cultura de tecidos vegetais podem possibilitar a propagação em larga escala, tanto para a captura e fixação de ganhos genéticos para efeitos ornamentais, quanto para a sua conservação. Alguns padrões de respostas morfogênicas *in vitro*, observados e descritos em bromélias revelam características diferenciadas dos sistemas regenerativos tradicionais baseados na organogênese e embriogênese somática (ALVES et al., 2006, GUERRA e DAL VESCO, 2010).

A embriogênese somática consiste no processo de regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro*, em que células somáticas ou haplóides desenvolvem-se em diferentes estádios embriogênicos, formando estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem fusão de gametas. É considerada um sistema modelo para estudos de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos em plantas superiores (BISPO et al., 2007; FERNADES et al., 2008).

As principais vantagens da embriogênese somática comparada com outros sistemas de propagação *in vitro* são as altas taxas de multiplicação obtidas, possibilidade de criopreservação de calos embriogênicos, uso de biorreatores, além da possível elaboração de sementes sintéticas (SILVEIRA et al., 2004)⁶

Segundo Parrot e Flinn (1995), a capacidade de indução da embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica dos explantes. Entretanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura, balanço hormonal, idade da planta e qualidade do explante (MENESES et al., 2005).

Os reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas, têm um papel fundamental neste sistema de cultivo. Evidenciando a importância das auxinas, conforme Komamine et al. (1992), elas são geralmente, utilizadas em altas concentrações com o objetivo de induzir competência às células necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência de células competentes.

Dentre as auxinas, o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos mais empregados em estudos de embriogênese (ALVES; et al. 2006). Estudos de

Valenzuela-Sanchez et al. (2006) evidenciaram que para a espécie *Agave tequilana* a maior porcentagem de calos embriogênicos foi obtida com o 2,4-D em comparação ao ácido naftaleno acético (ANA). O 2,4-D é uma auxina sintética e possui efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação (DAL VESCO, 2007).

O uso do Picloram também tem sido investigado em várias espécies, a formação de embriões somáticos em *Paspalum scrobitalum* ocorreu com a utilização de altos níveis de Picloram, isoladamente ou em combinação com cinetina (KAUR; KOTHARI, 2004). Picloram também foi efetivo na indução de embriogênese somática em eucalipto, nas concentrações de 5,0 e 10,0 μ M (TITON et al., 2007)

Outros importantes fitorreguladores como TDZ (Tiadizuron), 2-ip (2-isopentenil) e BAP, também têm significativa importância na indução de embriões somáticos (CHUNG et al., 2005 e GOMES et. al. 2006). Lin et al. (2007) observaram que para *Epipremnum aureum* cerca de 30 a 100 embriões/explante foram obtidos por meio de embriogênese, utilizando-se o TDZ.

Estudando o efeito de 2-ip na indução de embriões somáticos de bromélia *Vriesea reizii*, Alves, Vesco e Guerra (2006) concluíram que houve a indução de embriões somáticos e, o conseqüente desenvolvimento desses em plântulas, quando explantes basais foram cultivados em meio com 2-ip. Os estudos com embriogênese somática na família Bromeliaceae têm expandido muito nos últimos anos devido à necessidade de recuperação e preservação de alguns genótipos desta família ameaçados de extinção como as bromélias, o que pode ser evidenciado nas pesquisas de Alves et al.,(2006).

. *A. blancheteana* é uma espécie terrestre, nativa do Brasil, que é amplamente utilizadas no paisagismo, adaptada a todas as regiões do Brasil e vêm sendo extraída de seu ambiente natural para atender a demanda do mercado de plantas ornamentais (LORENZI; SOUZA, 1998).

A falta de um sistema de produção para atender o mercado de plantas ornamentais, aliada a coleta indiscriminada por moradores locais, para a comercialização dessas plantas vem ampliando desta forma a pressão extrativista, e colocando várias espécies na condição de ameaçada (ANACLETO, 2001).

Neste trabalho, objetivou-se induzir embriões somáticos utilizando segmento foliar de *Aechmea blancheteana* em meio de cultura com diferentes concentrações de reguladores vegetal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização dos experimentos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) em parceria com o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agropecuário (EBDA).

2.2. Material vegetal

Sementes de *Aechmea blancheteana* foram retiradas de frutos maduros e colocadas para secar sobre papel filtro durante três dias a temperatura ambiente. Sementes secas foram desinfestadas em álcool 70% durante um minuto e hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo por 15 minutos e posteriormente foram lavadas em água destilada autoclavada duas vezes e inoculadas em frascos de vidro (100 x 70 mm) contendo 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h, onde permaneceram por 50 dias.

2.3. Ensaio 1: Efeito do 2,4-D e Picloram na indução da embriogênese somática em *Aechmea blancheteana*

Foram utilizados como explantes segmentos de bases foliares com 0,5cm de comprimento de plantas de *Aechmea blancheteana* com 60 dias de idade, sendo utilizadas somente as folhas mais internas, desprezando as 4 folhas mais externas.

Para a indução da embriogênese somática foi utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 2,4-D ou Picloram nas concentrações 1,25; 2,50; 5,00 e 10,00 μM , mais um tratamento controle isento de regulador vegetal, totalizando 9 tratamentos.

Os explantes foram inoculados em placa de petri (25 mm x 100 mm), contendo 20 mL do meio de cultura, O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 60 dias. Após este período, para a indução de embriões somáticos, os calos embriogênicos foram subcultivados para um novo meio de cultura MS suplementado com $0,5 \mu\text{M}$ de ANA (ácido naftalenoacético), e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $60 \mu\text{mol. } \mu\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram por mais 30 dias.

2.4. Ensaio 2: Efeito do 2,4-D e BAP na indução da embriogênese somática em *Aechmea blanchetiana*

Como fonte de explantes, foram utilizadas folhas de plantas de *Aechmea blanchetiana* oriundas de sementes germinadas *in vitro* com 60 dias de idade. Para a indução da embriogênese somática foi utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com a auxina 2,4-D nas concentrações, 2,26; 4,53; 9,06; 22,5 μM e a citocinina BAP nas concentrações 0,0; 2,22 e 4,44 μM , em todas as combinações possíveis, totalizando 12 tratamentos.

Os explantes foram inoculados em placa de petri (25 mm x 100 mm), contendo 20 mL do meio de cultura. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 60 dias. Após este período, para a indução de embriões somáticos, os calos embriogênicos foram subcultivados para um novo meio de cultura suplementado com as mesmas concentrações de reguladores que o meio anterior, e em seguida foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, e densidade de fluxo de fótons de $60 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram por mais 30 dias.

Para os dois ensaios foram utilizadas 10 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 10 explantes. Foram avaliadas a porcentagem de explantes intumescidos e porcentagem de calos embriogênicos,

determinada pelo número médio de explantes com massa celular apresentando proembriões, e número médio de embriões formados.

2.5. Análise estatística

Para os dois experimentos os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Ensaio 1. Efeito do 2,4-D e Picloram na indução da embriogênese somática em *Aechmea blancheteana*

Ao avaliar o efeito de diferentes reguladores e concentrações na indução de calos, a partir de explantes foliares de *A. blancheteana*, foi observado que não houve diferenças estatísticas para a formação de calos embriogênicos (Tabela 1)

Neste trabalho foi possível verificar que altas concentrações de 2,4-D, (5,0 e 10 μM), proporcionaram as maiores médias de explantes intumescidos em *A. blancheteana* (Tabela 1).

O 2,4-D parece ser a auxina mais utilizada em sistemas experimentais, segundo Vasil (1982), a competência embriogenética é aparentemente adquirida durante o período inicial em cultura na presença de altos níveis desta auxina. George (1996) comenta que o 2,4-D tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada.

Para a auxina Picloram foi verificada maior porcentagem de explante intumescidos para as concentrações 1,25; 2,5 e 5,0 μM , sendo, 23, 29 e 16%, respectivamente. Também foi observado que para a maior concentração de Picloram avaliada (10,00 μM) a porcentagem de explante intumescidos foi reduzida para 2%. George (1996) afirma que este comportamento já é esperado, visto que a concentração requerida desse regulador é geralmente menor que a necessária para outras auxinas.

Tabela 1. Influência de diferentes reguladores e concentrações na indução de calos e regeneração de plantas em *Aechmea blanchetiana* a partir de explantes foliares.

Regulador vegetal	Concentração μM	Explante intumescido (%)	Calo embriogênico (%)
Controle	0,00	0c	0,00a
2,4-D	1,25	4c	0,00a
	2,50	17b	0,00a
	5,00	38a	2,86a
	10,00	45a	3,18a
Picloram	1,25	23b	0,00a
	2,50	29b	0,00a
	5,00	16b	0,00a
	10,00	2c	0,00a

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para as duas auxinas, os calos formados apresentaram bom aspecto, sendo de coloração amarelo-claro ou branco e de textura semicompacta, e aspecto friável. Para as concentrações 5,00 e 10,00 μM de 2,4-D observou-se a formação de calos com regiões apresentando agrupamentos celulares semelhantes a embriões em toda a superfície foliar. Inicialmente estes calos apresentaram coloração amarelo-claro, porém, após serem transferidos para um novo meio de cultura e para condição de luz, estes calos passaram a apresentar a coloração escura. (Figura 1).

Para Madhavi et al., (1995), esta coloração pode estar associada com o acúmulo de antocianina nas culturas de calos embriogênicos quando expostas à luz, este autor verificou a máxima concentração aos 12 dias de cultivo, após a transferência de calos de *Vaccinium macrocarpon* Ait, para condição de luz. Haq (2005) trabalhando com embriogênese somática do algodão também verificou a presença de pequenas quantidades de antocianina.

Neste trabalho foi observado o desenvolvimento de raízes e o estiolamento de brotos nos tratamentos, 1,25 e 2,50 μM de 2,4-D (Figura 2). Isto pode ser explicado pelo fato das auxinas serem reguladores de crescimento que

apresentam maior eficiência para indução de raízes, cuja função está relacionada com a divisão celular (SORACE et al., 2007).

Estes resultados corroboram com Molina et al., (2002) que verificaram que, ao utilizar o meio MS acrescido de 2,4-D, observou a indução de raízes e parte aérea em alguns explantes e formação de calos pequenos e brancos em explantes foliares de café. Pence et al. (1980), em experimentos com embriões zigóticos imaturos de cacaueteiro, concluíram que a combinação de auxinas (ANA, AIA e 2,4-D) estimula a embriogênese, porém, a adição de cada uma separadamente teve pouco efeito no processo embriogênico, este autor também relata a presença de raízes quando as auxinas foram estudadas separadamente.

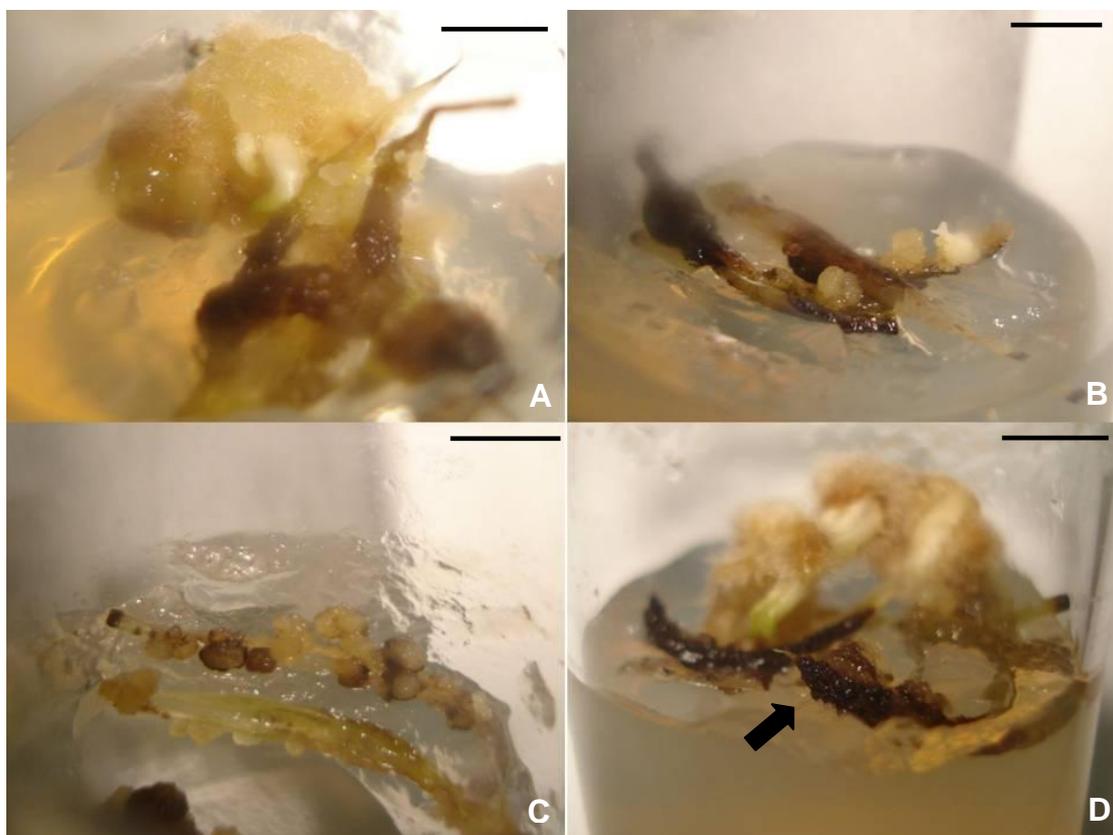


Figura 1. Explantes apresentando estruturas embriogênicas, obtidos de explantes foliares de *Aechmea blanchetiana*. (A e B); Calo obtido do tratamento com 5,00 μM de Picloram, a partir de explantes foliares de *Aechmea blanchetiana*, apresentando estruturas embriogênicas em toda a superfície foliar. (C); Calo apresentando coloração escura, 30 dias após ser transferido para condição de luz (D) (barra: 0,5 cm).

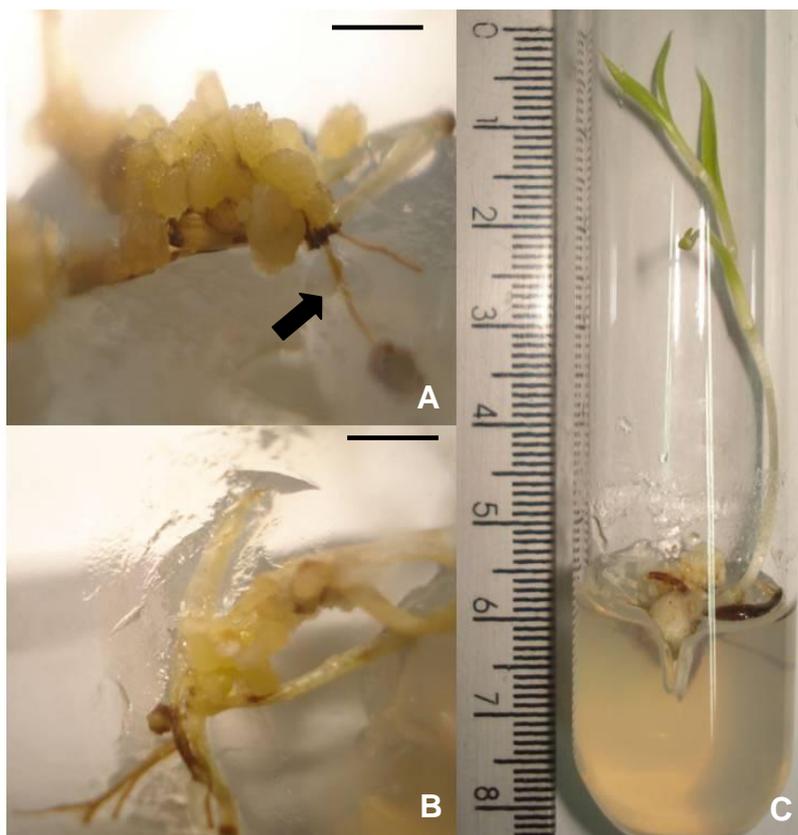


Figura 2. Calos apresentando raízes, obtidos do tratamento com 1,25 (A) e 2,50 μM de 2,4-D (B), a partir de explantes foliares de *Aechmea blanchetiana*); Broto estiolado formado a partir de calo obtido no tratamento 1,25 μM de 2,4-D. (C) (barra: 0,5 cm).

Os resultados deste trabalho mostram que é possível induzir e regenerar calos a partir de explantes foliares de *Aechmea blanchetiana*, porém, estes resultados sugerem a realização de uma investigação maior, visando ajustar este protocolo para uma melhor eficiência.

3.2. Ensaio 2: Efeito do 2,4-D e BAP na indução da embriogênese somática em *Aechmea blanchetiana*

A influência do BAP na porcentagem de explantes intumescidos foi verificada somente no tratamento com 9,06 μM 2,4-D (Tabela 2). Exceto nos tratamentos 9,06 e 22,5 μM de 2,4-D combinado com 4,44 μM de BAP, foi verificado que para todos os demais tratamentos, não houve diferença estatística, independente da concentração de 2,4-D e BAP estudada.

O balanço hormonal entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta, pode estimular a proliferação celular. Komanine et al. (1992) relataram que a auxina é necessária para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes. Em muitas espécies, o processo de iniciação de embriogênese somática é verificado ao se cultivar o explante em meio com a concentração relativamente elevada de 2,4-D, o qual tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular, resultando em agregados embriogênicos (GEORGE 1996).

Tabela 2. Efeito do 2,4-D e BAP na indução de calos embriogênicos em *Aechmea blancheteana*.

BAP(μ M)	2,4-D(μ M)							
	2,26		4,53		9,06		22,5	
	ER (%)	CE(%)	ER (%)	CE(%)	ER (%)	CE(%)	ER (%)	CE(%)
0,00	1,09a	0,17a	1,19a	1,35a	0,99a	0,78a	1,59a	0,87a
2,22	0,81a	0,11a	1,23a	1,14a	0,39b	0,59a	1,09a	0,23b
4,44	0,93a	0,03a	1,03a	1,12a	0,21b	0,15b	1,36a	0,97a
CV(%)	ER= 19,08%		CE=39,48%					

ER: explantes responsivos; CE: calos embriogênicos.

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

A rota embriogênica também foi induzida em 90,6% dos explantes foliares quando cultivados em meio com 20,0 μ M de 2,4-D em *Vriesea reitzii* (ALVES et al., 2006). Donato et al. (2000), estudando a indução de couve-comum, submetidos a diferentes combinações de 2,4-D e BAP, verificaram que na presença das mais reduzidas concentrações de BAP, os calos apresentavam melhor desenvolvimento. Bispo et al. (2007), relataram que em aveia, a presença da citocinina BAP no meio de cultura não influenciou a formação de calos embriogênicos nos diferentes genótipos estudados.

Com a transferência dos calos embriogênicos para condição de luminosidade, observou-se o desenvolvimento de embriões somáticos, sendo o tratamento constituído de 22,5 μ M de 2,4-D na ausência de BAP aquele que proporcionou maior número de embriões somáticos, cerca de 126,5 embriões, aos

90 dias de cultivo (Tabela 3). A Figura 3 apresenta as estruturas observadas aos 60 dias de cultivo.

Tabela 3. Efeito das combinações entre 2,4-D e BAP no número de embriões em *Aechmea blancheteana*.

BAP (μM)	2,4-D(μM)			
	2,26	4,53	9,06	22,5
0,00	17,1aC	54,5aB	38,9aB	126,5aA
2,22	15,6aB	14,2aB	23,7aB	87,31aA
4,44	0,03bB	0,19bB	1,08bB	11,67bA

CV(%) = 41,6

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas nas colunas e valores seguidos das mesmas letras maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Estruturas semelhantes às observadas neste trabalho (Figura 3), também foram relatadas por Rech Filho et. al. (2005) e Alves et. al. (2006), contudo, a regeneração das plantas ocorreu pela rota organogênica. Verifica-se ainda que em toda a extensão do explante houve formação e desenvolvimento dos embriões, independente da zona meristemática (Figura 3B).

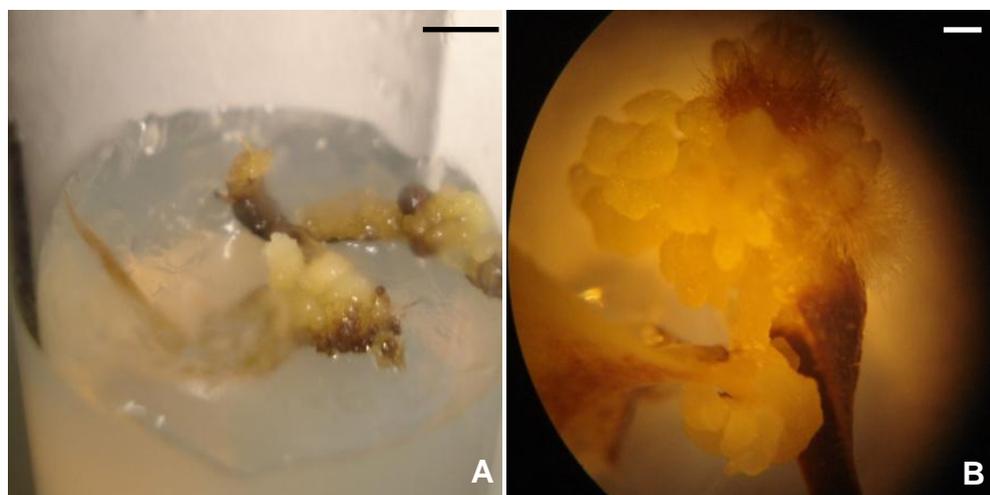


Figura 3. (A) Explantes intumescidos apresentando estruturas embriogênicas, obtidos de explantes foliares de *Aechmea blancheteana*; (B) Embriões somáticos aos 60 dias de cultivo (barra: 0,5 cm).

Com relação ao número de embriões verifica-se que o 2,4-D foi essencial para a indução dos embriões somáticos. Independente do tratamento, ao final deste trabalho foram obtidos 387,2 embriões somáticos, apesar disto, não foi verificado a conversão de nenhum embrião em plântula.

Em sistemas vegetais, os principais entraves para a utilização da embriogênese somática em larga escala consistem nas baixas taxas de indução e conversão de embriões em plantas normais (ARA et al., 2000 e EL MESKAOUI et al. 2006). Para Pinheiro (2012), a queda do potencial regenerativo pode ser explicada devido à liberação de antocianina no meio de cultura, sendo esta produzida a partir de sete dias de cultivo na presença de luz. Madhavi et al., (1995), trabalhando com *Vaccinium macrocarpon*, verificaram o acúmulo de antocianina nas culturas de calos embriogênicos quando expostas à luz, alcançando a máxima concentração aos 12 dias de cultivo, período a partir do qual o autor verificou um decréscimo no potencial de regeneração de embriões.

4. CONCLUSÕES

Na indução de calos embriogênicos a auxina 2,4-D apresentou maior eficiência quando comparado com o Picloram.

Na indução de embriões somáticos, o tratamento com 22,5 μM de 2,4-D foi o mais eficiente;

Para os dois ensaios não foi verificada a conversão de embriões em plântulas.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, G.M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**. v.110, n.1,p.204–207, 2006.

Ara H., Jaiswal U., and Jaiswal V.S., Synthetic seed: Prospectus and limitations, **Current Sci**, 78(12): 1438-1444, 2000.

BISPO, N. B., et. al. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Cienc. Rural**, v. 37, n.3, p. 890-893, 2007.

CHUNG, H.H.;CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Cytokinins direct somatic embryogenesis of *dendrobium chiengmai* pink and subsequent plant regeneration. **In vitro cellular and developmental biology plant**, v. 41, n. 1, p. 765-769, 2005.

DALVESCO, L. L.; RIBEIRO, R. J. ; GUERRA, M. P.; Otimização da micropropagação de bromélias ornamentais em sistema biofábrica. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, n.1, p. 725-728, 2007.

DONATO, V. M. T. S. ANDRADE, A. G. de; CABRAL, J. B.; ALVES, G. D. *In vitro* somatic embryogenesis of *common cabbage*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 711-718, abr. 2000.

El Meskaoui, A. Desjardins, Y.; Tremblay, F. M. Kinetics of ethylene biosynthesis and its effects during maturation of white spruce somatic embryos. **Physiologia Plantarum**. vol. 109 p, 333-342, 2000.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany** v.55, n.1, p.123-142. 1968.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERNANDES, E.H. et al. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v.38, n. 1, p.2604-2607, 2008.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2ª edição, Exegetics, Edington, v.1. 1996.

GOMES, F.L.A.F., et. al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica*(L.) Mill. (Cactaceae). **Scientia Horticulturae**, v.108, n.1, p.15-21, 2006.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology. **Humana Press- Springer**, v.589, n.1, p.47-66, 2010.

KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of *kodo millet*: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, n.1, p.73-79, 2004.

KOMANINE, A. et. al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v.28, n.1, p.11-14, 1992.

LIN, C.S.; et. al. *In vitro* flowering of green and albino *Dendrocalamus latiflorus*. **New Forests** 34:177–186, 2007.

MADHAVI, D.L. et al. Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait). **Journal of Food Science**, v.60, p.351-355, 1995

MENESES, A., D.; et. al. Effect of 2,4-D, hydric stress and light on *indica rice* (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. **Revista Biologia Tropical**. v.53, n.1, p.361-368, 2005.

MERKLE, S.A.; PARROT, W.A.; FINN, B.S. Morphogenicaspects of somatic embryogenesis. In: **In vitro embryogenesis in plants**. **Current Plant Science**

and Biotechnology in Agriculture, Thorpe, T.A. Ed. Kluwer Academic Publishers; v. 20, 155-204, 1995.

MOLINA, D. M., APONTE, M. E., CORTINA, H., MORENO, G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of *coffee*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 71, n.1, p. 117 – 123, 2002.

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

PENCE, V.C; HASEGAWA, P. M; JANICK, J. Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. *in vitro*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 98, n. 1, p. 1-14, 1980.

PINHEIRO, M. V. M. ; SILVA, T. C. R. ; MAIA, C. ; LIMA, B. V. ; Motoike, S. Y. Propagação *in vitro* de genótipos de alface via embriogênese somática. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v. 42, p. 1947-1953, 2012.

RECH FILHO, A. et. al. 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** v.14, n.1, p.1799–1808. 2005.

RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of *pecan* (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v.204, n.1, p.71-83, 1998.

SILVEIRA, V; et. al. Polyamines effects on the endogenous polyamines contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v.171, n.1, p. 91-98, 2006.

SORACE, M. et al. **Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 29, n. 4, p. 775-782, 2007.

TITON M., XAVIER A., OTONI W.C., MOTOIKE S.Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore** v.28, n.1, p. 643-654, 2007.

VALENZUELA-SANCHEZ, K. K; Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42, n.1, p. 336-340, 2006.

VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and rasses. In: **Plant Tissue Culture**. Fujiwara, Ed. 1, p. 101-103. 1982.

CAPÍTULO III

CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Aechmea blancheteana* (BAKER) L. B. Smith

RESUMO

Considerando a grande devastação da Mata Atlântica, atualmente com apenas 7,3% de sua área original preservada e onde cerca de 70% das bromélias são endêmicas, é importante o estabelecimento de métodos de conservação *ex situ* com o objetivo de preservar esse germoplasma e evitar uma erosão genética irreversível. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações dos reguladores osmóticos, sacarose, manitol ou sorbitol na conservação *in vitro* de *A. blancheteana*. As plantas de *A. blancheteana* foram colocadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS com 1/3 da concentração de sais, suplementados com sacarose, sorbitol ou manitol, totalizando 6 tratamentos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹. Os resultados mostraram que foi possível conservar sob condições de crescimento reduzido, plantas de *A. blancheteana* por doze meses em meio de cultura 1/3 MS suplementado com manitol.

Palavras chave: Reguladores de vegetais. Agente osmótico. Crescimento mínimo.

ABSTRACT

Considering the devastation of the Atlantic, currently only 7.3% of its original area preserved and where about 70% of the bromeliads are endemic, it is important to establish methods for ex situ conservation in order to preserve this germplasm and avoid irreversible genetic erosion. This study aimed to evaluate the effect of different concentrations of osmotic regulators, sucrose, mannitol or sorbitol *in vitro* conservation of *A. blanchetiana*. The plants of *A. blanchetiana* were placed in test tubes containing 15 ml of MS medium with 1/3 of the concentration of salts, supplemented with sucrose, sorbitol or mannitol, for a total of 6 treatments. Cultures were maintained in a growth room at 25 ± 2 ° C, photon flux density of $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 16 h light day⁻¹. The results showed that it was possible to keep under conditions of reduced growth, plants of *A. blanchetiana* for twelve months in culture medium third MS supplemented with mannitol.

Keywords: growth regulators. Osmotic agent. Minimum growth.

1. INTRODUÇÃO

A ação predatória, associada à redução e fragmentação da Floresta Atlântica, sem a reposição natural das espécies, vem provocando danos ambientais, entre estes a redução da diversidade específica de bromélias e de outras espécies (LEME, 1998 e ANACLETO, 2001).

Frente ao atual cenário de destruição ambiental, aliado a crescente demanda de mercado de ornamentais, torna-se imprescindível priorizar estratégias para preservar os recursos genéticos, bem como pesquisar novas técnicas de conservação, especialmente para as espécies nativas (MIACHIR, 2004).

A cultura de tecidos foi concebida como uma alternativa para a conservação de espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias ou aquelas propagadas vegetativamente (ENGELMANN, 1991) como é o caso das bromeliáceas.

A técnica de conservação *in vitro* consiste em aumentar ao máximo o intervalo entre subcultivos, diminuindo assim a estrutura física necessária e os custos de mão-de-obra quando comparado com outras formas de conservação *ex situ*, além de proporcionar ao melhorista acesso direto a todo o germoplasma da coleção (VIEIRA, 2002).

A conservação *in vitro* visa reduzir o metabolismo da planta, aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plântulas. Para tanto, têm-se utilizado como estratégia, modificações nas condições ambientais como luz e temperatura ou modificações químicas no meio de cultura como, nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento (ROCA et al., 1991).

Diferente dos reguladores vegetais que atuam diretamente nas rotas metabólicas da planta, os agentes osmóticos possuem sua ação relacionada com a redução do potencial hídrico no meio de cultura (CALDAS et al., 1998; ENGELMANN, 1991), portanto, para trabalhos de conservação *in vitro*, a utilização de agentes osmóticos como o manitol, sacarose e sorbitol é mais indicada do que o uso reguladores vegetais, já que estes favorecem a estabilidade genética do material em estudo.

Com relação aos agentes osmóticos, tais como o manitol, sorbitol e sacarose, estes atuam sobre o crescimento, reduzindo o potencial osmótico do meio de cultura, com isto, limitando a absorção de água e nutrientes para o explante.

Segundo Withers e Willians (1998), a concentração de 4% de manitol tem sido utilizada com sucesso para conservar propágulos de espécies de propagação clonal como tubérculos e raízes. Lima-Brito et al (2011) trabalhando com a interação de agentes osmóticos, luz e temperatura, verificou ser possível a conservação de *Syngonanthus mucugensis* utilizando meio MS½ contendo 43,83 mM de sacarose à 18 °C. Rocha (2010) observou que esta técnica é viável para a conservação de *Aechmea bromeliifolia* e *A. distichantha* sob condição de crescimento mínimo *in vitro* por 360 dias em meio MS½ contendo 82,36mM de manitol

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações dos agentes osmóticos, sacarose, manitol ou sorbitol na conservação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização dos experimentos

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agropecuário (EBDA).

2.2. Condições de cultivo

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

2.3. Germinação

Sementes de *Aechmea blanchetiana* foram retiradas de frutos maduros e colocadas para secar sobre papel filtro durante três dias a temperatura ambiente. Sementes secas foram desinfestadas em álcool 70% durante um minuto e

hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo por 15 minutos e posteriormente foram lavadas 3 vezes em água destilada autoclavada duas vezes e inoculadas em frascos de vidro (100 x 70 mm) contendo 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

2.4 Conservação

Plantas de *Aechmea blanchetiana* obtidas na etapa anterior foram reduzidas a um tamanho de aproximadamente 1 cm, após serem retiradas todas as folhas e raízes, 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 com $\frac{1}{3}$ da concentração de sais, suplementados com sacarose, sorbitol ou manitol, totalizando 6 tratamentos (Tabela 1), cada tratamento foi composto por 40 repetições, sendo cada repetição constituída de um tubo contendo um explante.

Tabela 1. Tratamentos utilizados na conservação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* com diferentes concentrações dos agentes osmóticos, sacarose, sorbitol e manitol.

Agente osmótico	Concentração	
	gL ⁻¹	mM
Sacarose	15	43,82
	30	87,65
Sorbitol	15	82,36
	30	164,73
Manitol	15	82,36
	30	164,73

Aos 360 dias de cultivo foi avaliado a sobrevivência, os comprimentos da parte aérea e da maior raiz (mensurado com auxílio de régua graduada em centímetro, considerando-se a medida compreendida entre a base do caule e a extremidade da maior folha), número médio de raízes (mensurado pela contagem das raízes individualmente, desconsiderando-se aquelas menores que 1 mm), número de folhas verdes e número de folhas senescentes (mensurado pela contagem das folhas individualmente).

Foi realizada a análise, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Para homogeneizar a variância, fez-se a transformação de dados usando a fórmula $\sqrt{v + 0.5}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do experimento não foi verificada a presença de plantas mortas. A análise dos dados apresentados na Tabela 1 indica que os agentes osmóticos utilizados tiveram influência significativa para as variáveis, comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz, porém, não foram significativos para as variáveis número de folhas verdes, número de folhas senescentes e número de raiz. Entre as fontes de carbono utilizadas neste experimento, o manitol proporcionou os menores comprimentos da parte aérea enquanto a sacarose e o sorbitol proporcionaram maiores médias para comprimento da parte aérea e da maior raiz (Tabela 2).

Com o objetivo de conservação, o uso de fontes alternativas de carbono em substituição a sacarose, vem sendo amplamente estudado no cultivo *in vitro* de várias espécies, bem como a redução nas concentrações habitualmente usadas desse agente osmótico. Estes procedimentos visam a redução das atividades metabólicas de plantas *in vitro* com isso favorecendo a conservação. Considerando o objetivo deste trabalho, o uso do manitol proporcionou os melhores resultados, visto que, de acordo com as variáveis avaliadas, promoveu o desenvolvimento mais lento das plantas ao final dos 12 meses.

Os resultados deste trabalho corroboram os obtidos por Souza et al. (2006) que verificaram ser possível conservar sob crescimento reduzido vitroplantas de *Ananas comosus var. erectifolius* em meio de cultura MS½ suplementado com 43,82 mM de manitol. Lima (2008), trabalhando com *Orthophytum mucugense*, verificou que a concentração de 87,64 mM de manitol favoreceu as menores taxas de crescimento, ainda que, os açúcares maltose e glicose também tenham proporcionado resultados satisfatórios, possibilitando o prolongamento dos intervalos entre subcultivos.

Em trabalhos de conservação *in vitro* de maracujá, Faria et al (2006) obtiveram os melhores resultados utilizando sorbitol, em substituição a sacarose.

Por outro lado, a associação entre as fontes de carbono, e as alterações de temperatura podem proporcionar resultados positivos na redução do metabolismo das plantas cultivadas *in vitro*, como o que foi obtido por Lemos et al (2002) na conservação *in vitro* de cana de açúcar, no qual o meio MS suplementado com 26,71 mM de manitol, associado com 29,23 mM de sacarose, sob temperatura de 15°C e 25°C possibilitou a conservação *in vitro* das plantas por um período de 12 meses.

Tabela 2. Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de raiz (NR) e comprimento da maior raiz (CMR) de *Aechmea blanchetiana*, aos 12 meses de cultivo *in vitro* em função do agente osmótico.

Agente osmótico	gL⁻¹(mM)	CPA (cm)	NFV (und)	NFS (und)	NR (und)	CMR (cm)
Sacarose	15 (43,82)	3,23c	2,90a	0,98b	2,59a	2,91c
	30 (87,64)	3,00c	2,96a	0,73a	2,30a	2,55ab
Sorbitol	15 (82,36)	3,03c	2,98a	0,77a	2,35a	2,94c
	30 (164,73)	2,86b	2,84a	0,81a	2,51a	2,52ab
Manitol	15 (82,36)	2,56a	2,77a	0,70a	2,60a	2,38a
	30 (164,73)	2,53a	2,89a	0,70a	2,49a	2,31a
CV (%)		25,00	8,76	4,41	4,60	9,98

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na tabela 2, pode-se observar que as plantas obtidas a partir dos tratamentos com 82,36 ou 164,73 mM de manitol promoveram, nesse estudo, redução dos valores de comprimento de parte aérea e comprimento da maior raiz. Entre as duas concentrações, não houve diferença significativa quando se utilizou 164,73 mM de manitol. A sacarose e o sorbitol promoveram maior desenvolvimento das plantas.

Por ser um composto não tóxico e apresentar efeito osmótico, o manitol tem sido muito empregado na técnica de cultura de tecidos, por simular condições de déficit hídrico (DUMET et al., 1993; THORPE et al., 2008). Estudos que utilizaram o manitol como agente osmótico obtiveram sucesso no estabelecimento de condições favoráveis a conservação *in vitro* em várias culturas, são exemplos, cana de açúcar (LEMOS et al., 2002), maracujá (FARIA et al., 2006) e abacaxi ornamental (SOUZA et al., 2006).

Para a variável número de folhas verdes, os tratamentos estudados não apresentaram efeito significativo, (Tabela 2). O tratamento com 43,82Mm de

sacarose apresentou maiores médias para a variável número de folhas senescentes. Estes resultados corroboram com os encontrados por Moreira (2008) que estudando a conservação *in vitro* *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, obteve resultados semelhantes em relação a diferentes fontes de carbono.

Neste trabalho apenas os tratamentos com 82,36 e 164,73 mM de manitol, apresentaram folhas senescentes (Tabela 1). Segundo Taiz e Zeiger (2004) a senescência é um processo codificado geneticamente e segue um curso previsível de eventos celulares, onde o cloroplasto é a primeira organela a se deteriorar no início da senescência foliar. Os tecidos senescentes realizam processos catabólicos que exigem a síntese de enzimas como, lípases, proteases, nucleases e enzimas degradadoras de clorofila.

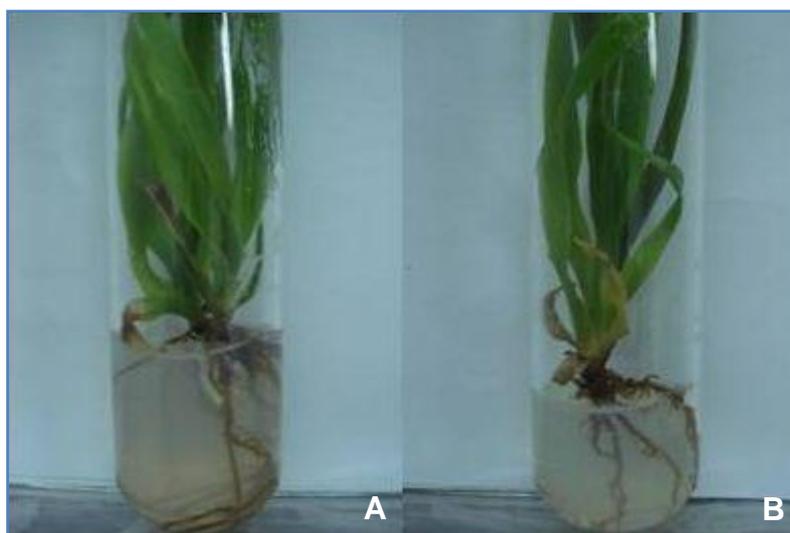


Figura 1. Plantas de *Aechmea blancheteana* apresentando folhas senescentes após 12 meses em meio de conservação. (A) 82,36 mM de manitol, (B) 164,73 mM de manitol.

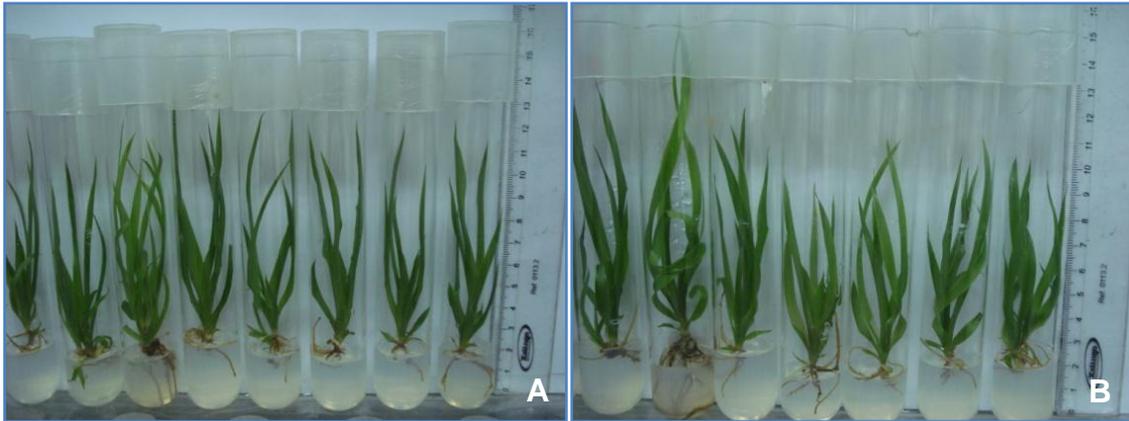


Figura 1. Plantas de *Aechmea blancheteana* após 12 meses em meio de conservação. (A) 43,82 mM de sacarose, (B) 87,64 mM de sacarose.

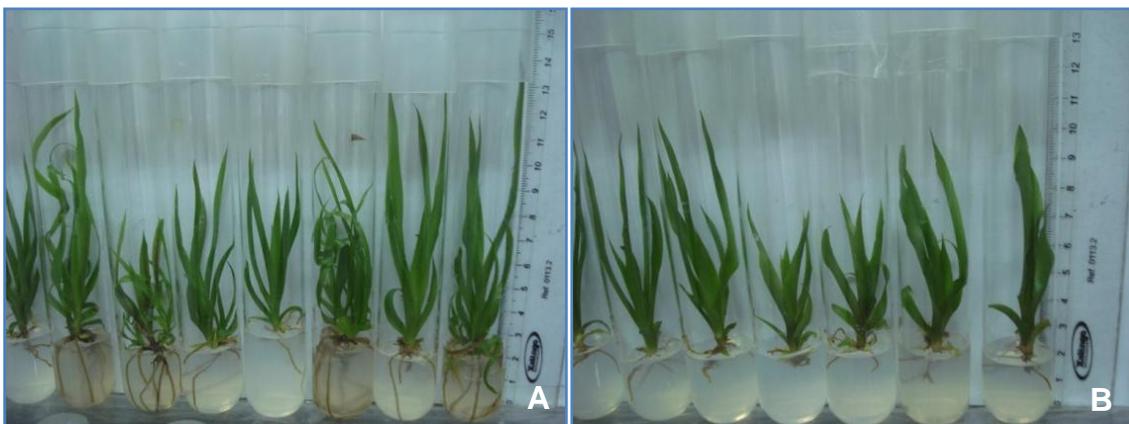


Figura 2. Plantas de *Aechmea blancheteana* após 12 meses em meio de conservação. (A) 82,36 mM de sorbitol, (B) 164,73 mM de sorbitol.

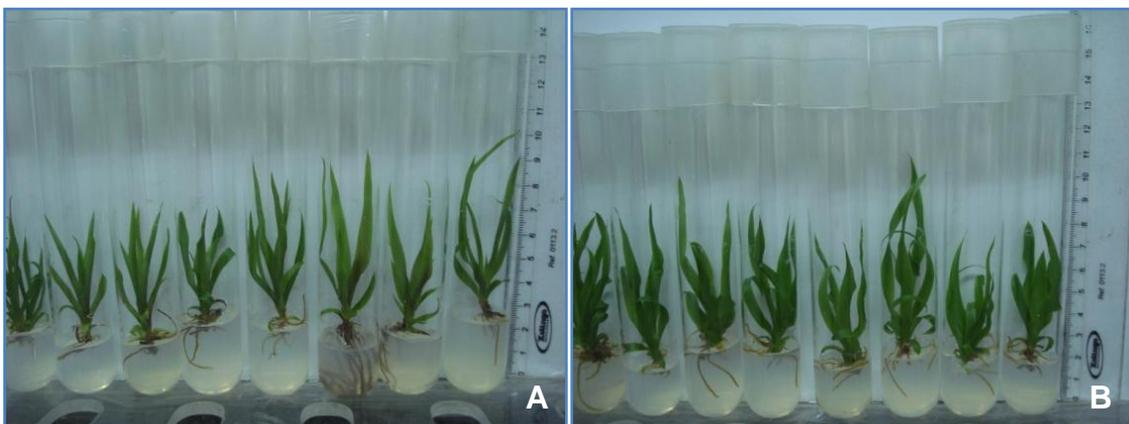


Figura 3. Plantas de *Aechmea blancheteana* após 12 meses em meio de conservação. (A) 82,36 mM de manitol, (B) 164,73 mM de manitol.

Nas condições deste trabalho, 100% dos explantes apresentaram desenvolvimento de raízes, não havendo diferença significativa para esta variável entre os tratamentos estudados, porém, para comprimento da maior raiz, os tratamentos com manitol apresentaram médias menores (Tabela 2). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Faria et al., (2006) quando, em estudos sobre a conservação *in vitro* de maracujazeiro, afirmam que tratamentos com sacarose no meio de cultivo favorecem o desenvolvimento de raízes.

O tratamento com manitol promoveu as menores médias para essa variável, corroborando com os resultados obtidos em coqueiro anão, por Léo et al., (2007) verificaram o menor desenvolvimento de raiz em plântulas mantidas em meio MS suplementado com manitol.

De acordo com os resultados observados neste trabalho, o manitol se mostrou mais eficiente que a sacarose e o sorbitol, visto que reduz o crescimento das vitroplantas, mantendo a viabilidade. A utilização destes agentes osmóticos para a redução do metabolismo celular no cultivo *in vitro* visando à conservação de germoplasma tem se mostrado eficiente a depender da espécie, como relatado para *Annona muricata* (LEMOS; BAKER, 1998), cana de açúcar (LEMOS et al, 2002), batata (FORTES; PEREIRA, 2003) e *Podophyllum* (LATA et al., 2010).

Apesar dos resultados negativos obtidos com algumas espécies, o uso de agentes osmóticos continua sendo testado na conservação *in vitro*, como uma das estratégias de redução de metabolismo celular a partir de alterações no meio de cultivo, a fim de evitar o uso de reguladores vegetais.

4. CONCLUSÕES

Nas condições deste trabalho, o meio de cultura MS 1/3 suplementado com 82,36 mM de manitol é o mais indicado para conservar por doze meses vitroplantas de *Aechmea blanchetiana* por 12 meses.

5. REFERÊNCIAS

ANACLETO, A. **Cultivo de bromélias e plantas ornamentais**. EMATER-PARANÁ. Guaratuba, 2001. 18 p. Relatório técnico. 128 p. 2004.

BRASIL. **IBAMA**. Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. Portaria Nº 37-N, de 3 de abril de 1992.

LIMA-BRITO, A. et. al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1354-1361, 2011.

CALDAS L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p.87-132.

CARVALHO FILHO, J.L.S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A.F.; SANTOSNETO, A.L.; AMANCIO, V.F. Produção de mudas de *Cássia grandis* L. em diferentes ambientes, recipientes e mistura de substratos. **Revista Ceres**, v. 40, n.1, p. 341-352, 2002.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2. ed. Cambridge, Estados Unidos: Cambridge University Press, 1993. p. 172-179.

DUMET, D; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, London, v.1, n. 14, p. 243-250, 1993

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. **Euphytica**, v.57, n.1, p. 227-243, 1991.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S.; Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *passiflora giberti* n. e. brown1 .**Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Batata-semente pré-básica: Cultura de Tecidos. *In*: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Eds.). *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. Embrapa Clima Temperado. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p.421-433. 2003.

KUBOTA, C.; RAJAPAKSE, N. C.; YOUNG, R. E. Low-temperature storage of micropropagated plantlets under selected light environments. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 3, p. 449-452, 1996.

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.

LEDO, A. da S.; CUNHA, A.O.; ARAGÃO, W.M.; TUPINAMBÁ, E.A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v.19, n.2, p.346-351, 2007.

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

LEMOS, M. de S. F.; ALENCAR, L. M. C. de; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M.M.S. ; ALVIM, B.F.M. ; RESENDE, S.V. ; BELLINTANI, M. C. ; SANTANA, J.R.F. . Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v. 41, p. 1354-1361, 2011.

LIMA, C.O. de C. **Micropropagação e crescimento *in vitro* de brotos de *Orthophytum mucugense* (WAND. E CONCEIÇÃO), uma espécie endêmica de Mucugê-Bahia.** 2008.77 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Feira de Santana -UEFS, Feira de Santana.

MIACHIR, J. I.; ROMANI, V. L. M.; AMARAL, A. F. de C.; MELLO, M. O.; CROCOMO, O. J.; MELO, M. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 427-432, 2004.

MONETTE, P. L. Cold storage kiwifruit shoot tip *in vitro*. **HortScience**, v. 21, n. 5, p. 1203-1205, 1986.

MOREIRA, M.J.S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas.** 2008. 68f. (Dissertação Mestrado) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

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

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

NEGRELLE, R. R. B.; ANACLETO, A.; MITCHELL, D. Local production and globalmarkets: lessons from southern Brazil. In: **“A Future Beneath the Trees”** International Symposium Proceedings, 2005, Victoria (BC), Canada

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* Del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-712.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. edição especial, p.70-84, 2000.

SILVA, A. B. Influência da benzimidamopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.26, n.6, p. 1190-1196, 2002.

SOUZA, E. L. S. Conservação de germoplasma *in vitro*. In: ARAÚJO, S. M. C.; OSUNA, J. A. (Ed.). In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Unesp, 1988. p. 96-101.

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**, v. 702, p. 41-47, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

THORPE T; et. al. The components of plant culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE EF; HALL MA; KLERK GJ (eds). **Plant propagation by tissue culture**, v.1, New York: Springer. p. 115-173, 2008.

VALOIS, A.C. C.; NASS, L.L.; GOES, M. de. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: Nass, L.L. (Org). **Recursos Genéticos Vegetais** - F:Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 500p.

VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS. M. C. Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (passion fruit). In: Y.P.S. BAJAJ (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, 38, Plant Protoplasts and Genetic Engineering VII, pp. 108-119. Springer Verlag, Berlin. 1996.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 14, p. 18-20, 2002.

WILKINS, C. P.; NEWBURY, H. J.; DODDS, J. H. Tissue culture conservation of fruit trees. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 1, n. 73-74, p. 9-20, 1988.

ZEE, F.T.; MUNEKATA, M. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas* spp.) germplasm. **HortScience**, v.27, n.1, p.57-58, 1992.