



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO

**MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE BROMELIÁCEAE  
ORNAMENTAIS.**

MOEMA ANGÉLICA CHAVES DA ROCHA

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
JUNHO - 2010

# **MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE BROMELIÁCEAE ORNAMENTAIS.**

**MOEMA ANGÉLICA CHAVES DA ROCHA**

Engenheira Agrônoma

Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 2002

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de concentração: Fitotecnia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Angélica P. de Carvalho Costa**

**Co-Orientador: Dr<sup>a</sup> Fernanda Vidigal Duarte Souza**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2010

Aos meus pais Hugo e Vilma, ao meu irmão Victor Hugo e minha cunhada Lúcia.

**DEDICO**

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica P. de Carvalho Costa  
e a minha amiga Dr<sup>a</sup>. Adriana Rodrigues Passos

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado a família e os amigos que tanto amo.

Aos meus pais, por me apoiarem em todas as minhas escolhas, por me ouvirem, por me admirarem, por acreditarem em mim, por seu amor incondicional.

A Victor Hugo, meu irmão e a Lídia, minha cunhada pelo amor, carinho, amizade e apoio.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica P. de Carvalho Costa pela orientação, amizade, confiança, carinho, generosidade, paciência, bom humor e ensinamentos transmitidos; por me aceitar, por ser mais do que uma orientadora; por ter sido companheira em toda minha trajetória de Pós-graduação.

A minha amiga Adriana, com quem dividi tudo, angústias, vitórias, alegrias, tristezas, incertezas, certezas, lágrimas, sorrisos; um agradecimento especial, pela amizade verdadeira, carinho e incentivo; pelo companheirismo; pelas palavras de conforto nos momentos difíceis; por acreditar mais em mim do que eu mesma.

A Dr<sup>a</sup> Fernanda Vidigal Duarte Souza pela Co-orientação, apoio, atenção; pelos ensinamentos transmitidos, compreensão e amizade.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Carlos Alberto da Silva Ledo pelo apoio constante, amizade e atenção.

Aos amigos e colegas do laboratório de cultura de tecidos da UFRB: Érika, Fábio, Tailane, Maria Josirene, Lucimário e Nei, um agradecimento especial pelo apoio, amizade, boa convivência, paciência, disposição e importante colaboração no desenvolvimento dos trabalhos.

A todos os amigos e colegas do curso de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB pelo apoio, amizade, companheirismo e boa convivência.

Aos amigos e colegas do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: Ádila, Frederico Henrique, Juraci, Juliana, Lorena, Everton Hilo, Taliane, Lucymeire, Daniela Garcia pelo apoio, amizade e convivência agradável.

Ao Dr<sup>o</sup> Antônio Souza pelo apoio, atenção e colaboração.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Edson Duarte e a amiga Prof<sup>a</sup> Maria Cristina Alfaya pelo apoio e importante colaboração nos trabalhos de germinação.

As amigas e companheiras de todas as horas; Jose, Michele, Ana Paula, Tamires pela amizade, apoio e ótima convivência; pelos muitos momentos de descontração; vocês são muito importantes p/ mim.

Aos novos grandes amigos Uriálisson e Igor, que chegaram ao finalzinho dessa etapa, mas que fizeram uma diferença enorme.

Aos participantes da banca examinadora de qualificação Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. Weliton Almeida, Dr<sup>a</sup> Tatiana Góes Junghans e Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. Clóvis Pereira Peixoto, pela importante contribuição.

Aos participantes da banca examinadora da defesa de Tese.

Aos professores do curso de Graduação do Centro de Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais - UFRB e Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os funcionários do Centro de Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais - UFRB e da Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFBA, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro de Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais - UFRB, por ceder o laboratório de cultura de tecidos onde foram realizados parte dos trabalhos.

Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Vital, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Áureo e ao NEAS por ceder o laboratório onde foram realizados parte dos trabalhos.

Ao grupo INSECTA e seus integrantes pela disponibilização do microscópio para a retirada das fotos da germinação.

A todos os estagiários do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical pelo apoio e boa convivência.

A todos os funcionários da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em especial aos funcionários do laboratório de cultura de tecidos: Hélder Carvalho pelo apoio, amizade, incentivo e importante colaboração; Honorato e Tânia pela importante colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical por ceder o laboratório de cultura de tecidos onde foram realizados parte dos trabalhos.

À FAPESB pela concessão da bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que não cito aqui, mas não menos importantes, e que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho; serei sempre grata.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	9
Capítulo 1	
PRODUÇÃO DE MUDAS DE BROMELIACEAE <i>IN VITRO</i> .....	24
Capítulo 2	
EFEITO DA SACAROSE E DO MANITOL NA CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> PARA O CRESCIMENTO MÍNIMO EM BROMELIACEAE.....	46
Capítulo 3	
GERMINAÇÃO E VIGOR DE PLÂNTULAS DE DUAS ESPÉCIES DE BROEMELIACEAE EM DIFERENTES SUBSTRATOS.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98

# MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE BROMELIACEAE ORNAMENTAIS.

Autor: Moema Angélica Chaves da Rocha

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica P. de Carvalho Costa

**RESUMO:** O trabalho teve como objetivo estudar a multiplicação e conservação *in vitro* de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, e a germinação e vigor de plântulas de *Hohenbergia stellata* Schultes f. e *Neoregelia sanguinea* em diferentes substratos. Para a multiplicação *in vitro* segmentos do talo foram incubados em meio de cultura MS suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. As melhores médias de brotos/explante, independente das espécies estudadas, ocorreram no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Para a conservação *in vitro* plântulas com aproximadamente foram incubadas em meio de cultura MS e ½ MS, acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> com sacarose ou manitol ou a combinação da sacarose com o manitol, onde permaneceram por 360 dias. Os melhores resultados da ocorreram em meio ½ Ms contendo 15 g.L<sup>-1</sup> de manitol, independente da espécie estudada, sem comprometer a fase de recuperação do material conservado. Para a germinação e vigor de plântulas as sementes foram submetidas a cinco tratamentos: Papel no escuro; Papel, areia, Vermiculita<sup>®</sup> e Plantmax<sup>®</sup> na luz; e mantidas em câmaras BOD a 30 °C. As avaliações da germinação foram diárias. Foi considerada como semente germinada quando ocorreu o rompimento dos tegumentos e protrusão da raiz primária. A germinação iniciou-se a partir do 4º dia após a semeadura para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. e a partir do 5º dia para a *Neoregelia sanguinea*. A germinação foi caracterizada como do tipo epígea e plântulas criptocotiledonares para ambas as espécies. O substrato Vermiculita<sup>®</sup> se destacou para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. Para a *Neoregelia sanguinea* os substratos avaliados não diferiram entre si.

**Palavras-chave:** Recursos genéticos, BAP, manitol, substrato.

# MULTIPLICATION AND CONSERVATION OF ORNAMENTAL BROMELIACEAE.

Author: Moema Angélica Chaves da Rocha

Advisor: Dr<sup>a</sup> Maria Angélica P. de Carvalho Costa

**ABSTRACT:** This study aimed to study the *in vitro* multiplication and conservation of *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* LBSm and *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, and germination and seedling vigor in *Hohenbergia stellata* Schultes f. *Neoregelia sanguinea* and on different substrates. For the *in vitro* multiplication of the stem segments were incubated in MS medium supplemented with 30 gL<sup>-1</sup> sucrose, 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel<sup>®</sup>, 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA and 0.0, 2.0, 4.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup> BAP. The best mean shoots / explant, regardless of species, occurred in the treatment with 2.0 mg.L<sup>-1</sup> BAP and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA. For the conservation of *in vitro* plantlets were incubated with approximately in culture medium MS and ½ MS plus 2 g L<sup>-1</sup> Phytigel<sup>®</sup> with sucrose or manitol or a combination of sucrose with manitol, where they remained for 360 days. The best results occurred in ½ MS medium containing 15 gL<sup>-1</sup> of manitol, regardless of the species studied, without compromising the recovery phase of the preserved material. For germination and seedling vigor seeds were subjected to five treatments: Role in the dark; paper, sand, vermiculite and Plantmax<sup>®</sup> in light, and kept in BOD at 30°C. Assessments of germination were daily. Was considered germinated seed when there was disruption of the tegument and radicle protrusion. The germination started from the 4th day after sowing for *Hohenbergia stellata* Schultes f. and from day 5 to *Neoregelia sanguinea*. Germination was characterized as a cryptocotylar epigeal and seedlings for both species. The substrate Vermiculite<sup>®</sup> stood out for *Hohenbergia stellata* Schultes f. *Neoregelia sanguinea* for the substrates used did not differ.

**Keywords:** Genetic resources, BAP, manitol, substrate.



## INTRODUÇÃO

Exóticas e donas de uma enorme diversidade de cores e tamanhos, as Bromeliaceae conquistaram seu espaço nos projetos paisagísticos. A popularização dessas plantas é um processo relativamente recente, dos famosos jardins de Burle Marx (MELO, 1996), passaram a ser presença quase obrigatória tanto nos jardins e residências mais simples como nas mais sofisticadas.

Cristóvão Colombo foi o primeiro europeu a maravilhar-se com uma Bromeliaceae, o abacaxi (*Ananas comosus*), na Ilha de Guadalupe no Caribe em 1493, porém há que diga que estas plantas foram descobertas pelo explorador francês Abade Charles Plumier Bégon no final do século XVII. A beleza versátil dessa planta nativa das Américas nunca mais deixou de impressionar (SUPERINTERESSANTE, 1999). Segundo Rabelo (2009) a denominação das bromélias é atribuída ao Padre francês Charles Plumier que assim o fez em homenagem ao botânico sueco Olaf Bromel. Popularmente são conhecidas como bromélias, caraguatás ou gravatás. Podem ser encontradas tanto ao nível do mar como em montanhas com quatro mil metros de altitude, como a *Imperialis*. Dependendo da espécie, elas sobrevivem em desertos, em lugares úmidos e até em temperaturas abaixo de zero.

As bromélias podem ser encontradas em todo o território brasileiro, sendo a Floresta Atlântica seu principal reduto. Segundo Leme (1996) além da significância, enquanto entidade biológica ressalta-se que as Bromeliaceae apresentam elevado grau de importância ecológica nos ecossistemas onde se inserem. Destas plantas dependem os ciclos de vida de uma série de animais como pequenos anfíbios e insetos. São também importantes fontes de recursos até mesmo para algumas espécies de primatas, como os micos que se alimentam de seus frutos e infrutescências, além de ingerirem a água armazenada entre suas folhas (ROCHA et al. 1997).

O consumo de espécies da família Bromeliaceae no Brasil foi iniciado a partir da década de setenta, quando a *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, uma planta nativa do Rio de Janeiro, despertou grande procura por parte de consumidores de plantas

ornamentais. A insuficiência de plantas desta espécie provocou, também, uma difusão de outras espécies de menor expressão comercial. Iniciava-se nesta época, portanto, o ciclo de extrativismo de bromélias com finalidade lucrativa no Brasil. Este processo, inicialmente observado no Rio de Janeiro, também ocorreu em vários outros estados (COFFANI-NUNES, 1997).

A comercialização dessas plantas é expressiva, para colecionadores e comerciantes, o que incentiva a coleta ilegal de espécies de maior beleza, acarretando a redução de populações naturais e aumento do número de espécies em risco de extinção (MELO, 1996). Frente a crescente demanda associada à alta disponibilidade de bromélias em ambiente natural e o acesso amplamente facilitado a estas, o extrativismo de bromélias no Brasil teve contínua ampliação. Esta ação predatória, associada à redução e fragmentação da Floresta Atlântica, sem a reposição natural dos estoques nas florestas, provocou grandes danos ambientais, entre estes a redução da diversidade específica. Em 1990, registra-se que várias espécies de bromélias estavam ameaçadas de entrar em processo de extinção como, por exemplo: *Aechmea apocalyptica* Reitz e *Vriesea pinottii* Reitz (BRASIL, 1992).

A preocupação com o extrativismo predatório tem levado a pesquisa protocolos de propagação e conservação das espécies nativas, a fim de que a exploração excessiva do germoplasma nacional não conduza a um cenário de erosão genética irreversível e segundo. Segundo Silveira (2009) a produção de mudas para atender ao mercado seria uma estratégia para reduzir o extrativismo, além de regularizar essa cadeia e garantir a demanda, entretanto a propagação das bromélias é lenta, e geralmente após a floração, apenas uma muda é produzida por planta (HOSOK; ASAHIRA, 1980).

As espécies nativas, de um modo geral, apresentam crescimento lento, daí também a importância de se definir um substrato que promova boa a velocidade e uniformidade na germinação aliado a temperatura e a boas condições fisiológicas da semente. O teste de germinação é o parâmetro oficial mais utilizado para a avaliação da qualidade fisiológica de uma semente, sendo de elevada importância em programas de controle de qualidade (CAMPOS, 1997) e segundo Aguiar et al. (1993) o conhecimento da germinação tem sido ressaltado, por diversos autores, como imprescindível para se compreender o ciclo biológico e os processos de estabelecimento da vegetação nativa, assim como para produção de mudas em

viveiros. Para um grande número de espécies cultivadas existem recomendações para condução do teste de germinação (BRASIL, 1992). No entanto, espécies como as a família Bromeliaceae necessitam de informações. Segundo Mercier e Guerreiro Filho (1990) a germinação de sementes é um aspecto pouco estudado na reprodução de bromélias.

A micropropagação de Bromeliaceae tem sido considerada uma importante técnica para otimizar a produção dessas plantas de modo a atender o mercado de ornamentais, e já vem sendo relatada com êxito. Vários estudos foram realizados visando o cultivo *in vitro* de bromélias de interesse comercial e também das bromélias endêmicas, raras e/ou ameaçadas de extinção (RECH-FILHO et al. 2005; MOREIRA, 2008; MOREIRA et al. 2008; SILVEIRA et al. 2009). A possibilidade da utilização dos métodos de conservação *in vitro* também é atrativa tanto por motivos econômicos quanto práticos, sendo um componente adicional importante do tratamento de recursos genéticos (WITHERS; WILLIAMS, 1998). O emprego das técnicas de cultura de tecidos *in vitro* é de grande interesse para a conservação de germoplasma de espécies com sementes recalcitrantes, de espécies que se propagam vegetativamente, bem como de espécies em extinção, genótipos elite e material geneticamente modificado (ROCA et al., 1991; ENGELMAN, 1998).

### **Família Bromeliaceae**

A família Bromeliaceae são plantas monocotiledôneas e está dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae Harms, Tiliandisiodeae Harms e Bromelioideae Reichenbach, sendo todas nativas das zonas tropicais e subtropicais do continente americano entre os paralelos 37°N e 44°S nas mais variadas condições de altitude, temperatura e umidade (WENDT, 1999), com exceção de uma única espécie, *Pitcairnia feliciana*, que ocorre na África. Segundo Smith e Downs (1974) as bromeliáceas ocorrem desde o nível do mar até as montanhas andinas a cerca de 4.000 metros de altitude. Seus representantes são encontrados em todos os tipos de vegetação, desde ambientes mesofílicos até xéricos (BENZING, 2000). No Brasil, ocorrem cerca de 40% das espécies e 73% dos gêneros, sendo que destes, 80% são encontrados na Mata Atlântica (LEME; MARIGO 1993). De acordo com Luther (2006) compreende 58 gêneros e cerca de 3.086 espécies. Os principais gêneros de

bromélias ornamentais comercializados são *Neoregelia*, *Vriesea*, *Guzmania* e *Aechmea*.

Inventários florísticos em diversos trechos do domínio Atlântico vêm apontando a Bromeliaceae entre as famílias de maior riqueza e diversidade tanto genérica quanto específica (AMORIM et al., 2005; MARTINELLI, 2006) apresentando grande variabilidade de formas, sendo em geral plantas bem características e ornamentais. Segundo Rizzini (1997) e Benzing (2000) os diferentes habitats e, especialmente, a natureza do substrato influenciam no aspecto da planta, que pode variar amplamente em tamanho e coloração das folhas, assim como na morfologia das flores.

### **Subfamília Bromelioideae**

Bromelioideae inclui 29 gêneros e cerca de 760 espécies (BENZING, 2000), concentradas principalmente na Mata Atlântica (MARTINELLI et al. 2008). Além do gênero Bromélia que serviu de base para a descrição da família e da subfamília diversos outros ocorrem no Brasil, tais como: *Aechmea*, *Ananas*, *Billbergia*, *Canistrum*, *Nidularium* e *Quesnelia* (WANDERLEY, 1992). A subfamília é caracterizada por abrigar espécies epífitas, terrestres ou rupícolas, com folhas de margens aculeadas; escamas peltadas com células irregularmente arranjadas; ovário ínfero; óvulos obtusos a caudados; frutos bacáceos e sementes não aladas (SMITH; DOWNS 1974; MOREIRA et al., 2006; GIVINISH et al., 2007).

### **O gênero *Aechmea***

O gênero *Aechmea* ocorre desde o México e Antilhas até o Uruguai e Norte da Argentina (REITZ, 1983). Agrupa 172 espécies em oito subgêneros (SMITH; DOWNS, 1979). As plantas são de porte herbáceo, com tamanho que variam entre 40 e 80 centímetros, muito usada na ornamentação de paisagens domésticas. Muitas das espécies deste gênero são epífitas e possui cerca de 170 espécies. As folhas apresentam faixas transversais brancas sobre o fundo verde na parte adaxial e roxo escuro numa parte abaxial. Sua reprodução se dá por brotamento do rizoma e por sementes. Apresentam inflorescência simples, vistosa, forma piramidal e com longa durabilidade, flores com pétalas e sépalas, ovário ínfero, fruto baga, vivamente

colorido A planta pode atingir a dimensão de 0,50 x 0,50 m na sua fase adulta (REITZ, 1983; LORENZI, 2001; PAULA, 2000).



**Figura 1.** *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia* (A), *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* (B), *Aechmea multiflora* L.B.Sm (C).

### O gênero *Hohenbergia*

São plantas encontradas no Brasil, Venezuela e Pequenas Antilhas. É composto por 50 espécies. Plantas epífitas, terrestres ou saxícolas herbáceas acaules. Folhas em rosetas, polísticas, bainha geralmente larga, castanho-escuro na base, lâmina

ligulada ou subtriangular espinoso-serrada. Escapo bem desenvolvido, brácteas escapais imbricadas. Inflorescência de espigas estrobiladas, 2-4 pinadas. Brácteas florais sempre cobrindo o ovário e as sépalas, flores sésseis, sépalas assimétricas, nunca mucronadas, pétalas com duas lígulas, a lâmina divergente na antese. Estames inclusos, ovários totalmente inferiores, óvulos longos caudados. Fruto baga, semente elíptica (PAULA; SILVA, 2004; CARVALHO, 1994).



**Figura 2.** *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* (A), *Hohenbergia stellata* Schultes f. (B). Cruz das Almas – BA, 2010.

### O gênero *Neoregelia*

A maioria das espécies são epífitas ou rupícolas. São encontradas no Brasil, Colômbia, Equador e Peru. Uma descrição mais específica é dada por Blossfeld (1964), que descreve as bromélias do gênero *Neoregelia* como plantas que possuem folhas largas, arqueadas, com suas margens espinhentas. As inflorescências se formam numa depressão no centro da planta, formando um receptáculo para recolher água. As folhas que rodeiam as inflorescências são brilhantes e coloridas. Os frutos se desenvolvem dentro da água. A beleza destas plantas reside no colorido extraordinário que as folhas internas do funil tomam na época da floração. Este maravilhoso colorido persiste durante vários meses e desaparece só com a maturação dos frutos e subsequente morte do caule, que logo é substituído pelos

brotos, os quais já antes do início da floração surgem em sua base para perpetuar a espécie.



**Figura 3.** *Neoregelia sanguinea*. Cruz das Almas –

### **Propagação**

A propagação em Bromeliaceae pode ser tanto seminífera quanto vegetativa através de brotações laterais. De acordo com Reitz (1983), o processo de autofecundação parece ser raro em bromeliáceas, uma vez que a maioria das flores estudadas é protândrica. Sendo a polinização feita, principalmente, por morcegos, borboletas, abelhas e mangangavas. Em ambientes fechados a polinização artificial deve ser realizada de preferência usando indivíduos diferentes, pois a auto-esterilidade ocorre com frequência. Segundo Paula (2000), este tipo de propagação, devido à grande desuniformidade no desenvolvimento das plantas, tem dificultado o plantio comercial. Além do que, a propagação sexuada de bromélias é demorada, pois apenas para a maturação das sementes pode levar até um ano após a polinização, dependendo da espécie.

Plantas epífitas, como as da família Bromeliaceae, na propagação sexuada, por apresentam crescimento lento, exigem para seu desenvolvimento substratos de baixa densidade, alta permeabilidade e aeração e que promovam boa a velocidade e uniformidade na germinação, isso tudo aliado à temperatura e a boas condições fisiológicas da semente (CAMPOS, 1997).

Quanto à propagação vegetativa as taxas de multiplicação pelos métodos convencionais são muito baixas, demandando bastante tempo para a obtenção de um número de mudas, haja vista que o número de brotações laterais formadas pela planta matriz é bastante limitado. De acordo com Ventura et al. (1993) a taxa média de produção de mudas por planta varia de 3 a 6 mudas ao final de um ano e meio.

### **Propagação *in vitro***

A técnica de cultivo *in vitro* pode ser aplicada para as duas formas de propagação em Bromeliaceae. Na propagação sexuada o uso de sementes permite o maior número de plantas, que ecologicamente pode ser usadas na preservação de espécies ameaçadas (ZORNIG, 1996; SARASAN et al. 2006).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos explantes, é a aplicação prática da cultura de tecidos. Diversos países do mundo utilizam a técnica de micropropagação em escala comercial com intuito de acelerar os métodos convencionais de propagação de espécies de interesse comercial, como as plantas ornamentais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação é realizada em quatro estágios, os quais podem ser manipulados através da modificação do meio e das condições ambientais. Esses estágios são: (1) estabelecimento; (2) multiplicação; (3) formação de raiz, que pode ser realizada tanto em condições *in vitro* como *ex vitro* e (4) aclimatização (HARTMANN et al. 2002). Esse processo baseia-se na totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula do organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (FRÁGUAS, 2009). Entretanto, existem diferenças nos protocolos de multiplicação estabelecidos para diferentes espécies, que vão depender das peculiaridades do explante bem como da espécie de interesse (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

### **6.3 Conservação *in vitro***

A conservação dos recursos genéticos vegetais, frente ao atual cenário de destruição ambiental, é hoje uma demanda de interesse global e segundo Amaral (2005), é imprescindível priorizar estratégias para preservar os recursos genéticos,



bem como pesquisar novas técnicas de conservação, especialmente para as espécies nativas.

A conservação de germoplasma, de acordo com Mendes e Góes (1996), pode consistir na manutenção de coleções nos seus próprios locais de ocorrência, nesse caso chamada de conservação *in situ*. Também é possível preservar os recursos genéticos (na forma de embriões, sementes, explantes e indivíduos) por meio da conservação *ex situ*, isto é, em locais e condições distintas aos de ocorrência natural, podendo ocorrer *in vitro* ou *ex vitro*.

O processo de conservação *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma no campo (*ex vitro*), e dentre elas destacam-se a necessidade de menor espaço para ocupação do material; manutenção de material vegetal livre de patógenos; disponibilidade de material para ser imediatamente propagado, e tem o objetivo de reduzir ou até suprimir o crescimento das células e tecidos, diminuindo drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade (DORION et al., 1991; WITHERS; WILLIAMS, 1998) aumentando ao máximo o intervalo entre os subcultivos, reduzindo-se assim a mão-de-obra e o espaço necessários para a sua conservação.

Entre as técnicas mais utilizadas para reduzir o crescimento *in vitro* encontra-se a redução da temperatura de incubação e a aplicação de agentes osmóticos e hormonais ao meio nutritivo (CONCEIÇÃO et al., 1998; MARTIN et al., 1998; GOLMIRZAI; TOLEDO, 1999). Outro procedimento indicado para o mesmo objetivo é o de diminuir a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura. Tem sido relatada a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS, para diversas espécies, visando melhorar o desenvolvimento das plantas e à redução nos custos (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Paiva et al. (1997) utilizaram 50% dos sais do meio MS, obtendo um bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia. Concentrações de sais no meio básico MS, reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira preta, cultivar 'Caiguangue' (DANTAS et al., 2000).

Os agentes osmóticos, tais como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993). Todavia, vale salientar que

essas técnicas, ao estender o intervalo entre os subcultivos, não devem comprometer a qualidade e viabilidade dos explantes.

A redução da temperatura nas salas de crescimento, aliada a diminuição na concentração dos macronutrientes e micronutrientes e da concentração de sacarose do meio de cultura, têm sido estratégias que, ao serem aplicadas conjuntamente, vem obtendo sucesso no estabelecimento de condições favoráveis a conservação *in vitro* em algumas culturas como a maçã, pêra, ameixa e cereja (WILKINS et al., 1988); a cana de açúcar (LEMOS et al., 2002), o abacaxi (ZEE; MUNEKATA, 1992; BALZON et al., 2008).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente para a multiplicação e conservação sob crescimento mínimo, ambos *in vitro*, das espécies *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, vulneráveis a extinção, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, bem como identificar substratos que promovam melhor germinação e desenvolvimento pós-seminal das Bromeliaceae *Hohenbergia* sp. e *Neoregelia* sp.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. Sementes florestais tropicais. **Abrates**. Brasília, 350p. 1993.
- AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis**. 2005. 94f. (Dissertação Mestrado), Instituto Agrônomo (IAC). Campinas, 2005.
- AMORIM, A. M. A.; Fiaschi, P.; Jardim, J. G.; Thomas, W. W.; Clifton, B. C.; CARVALHO, A. M. V. **The vascular plants of a forest fragment in Southern Bahia, Brazil**. Sida 21(3): 1727-1757, 2005.
- BALZON, T. A.; CARDOSO, L. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi (*Ananas* sp.) sob regime de crescimento mínimo. **XX Congresso Brasileiro de Fruticultura 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture** 12 a 17 de Outubro de 2008 - Vitória/ES.
- BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. Cambridge University Press, 590p. 2000.

- BLOSSFELD, H. **Orquídeas e Bromélias nº 2**, São Paulo, ed. Chácaras e quintais, 69 p., 1964.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 35 p. 1992.
- CAMPOS, V. TILLMANN, M. A. A. Avaliação da metodologia para teste de germinação em sementes de tomate. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 3, n. 1, p. 37-42, 1997.
- CARVALHO, L. F. N. Bromélia. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**. v.1, 40 p. 1994.
- COFFANI-NUNES, J. V. **Estudos florísticos e fenomorfológicos de Tillandsioideae (Bromeliaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais**. 1997. 129 p. Dissertação (Mestrado em Taxonomia Vegetal), USP, São Paulo.
- CONCEIÇÃO, A. M. da; FORTES, G. R. de L.; SILVA, J. B. da. Conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum*) cvs. Baronesa e Santo Amor: efeito sobre a formação de gemas e brotações dos segmentos caulinares. **Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas**, v. 1, n. 1, p. 67-71, 1998.
- DANTAS, M. C. A.; CERETTA, M.; COUTINHO, F. E.; FORTES, G. R. de L. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caigangue. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 123-130, 2000.
- DORION, N.; KADRI, M; BIGOT, C. *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. *Acta Horticulturae*, n. 298, p. 335-343, 1991.
- 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, n. 14, p. 243-250, 1993.
- FRADE BROMÉLIAS. Disponível em: <<http://www.fradebromelias.com.br>> Consultado em 16/07/2009.
- FRÁGUAS, C. B.; PEREIRA, A. R.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de espécies ornamentais. Acesso<[www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol\\_99.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_99.pdf)> Consultado em 19 de agosto de 2009.

- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, p. 99-169, 1998.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BARRY, P. E.; SYTSAM, K. J. Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. In: Colombus, J. T., FRIAR, E. A., PORTER, J. M., PRINCE, L. M.; SIMPSON, M. G. (eds.) **Monocots: Comparative Biology and Evolution-Poales. Rancho Santa Ana Botanic Garden**, Claremont, CA, pp. 3-26. 2007.
- GOLMIRZAI, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweet potato germplasm. In: ARTHUR, C.; FERGUNSON, P.; SMITH, B. (Ed.). *Impact on a changing world: program report 1997-1998*. Lima: International Potato Center, 1999. p. 351-356.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 880 p. 2002.
- HOSOKI, T. & ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience** 15(5): 603-604. 1980.
- LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Canistrum: Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Editora Sextante, 108 p. 1996.
- LEMONS, 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**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa. **Plantarum**, 1085p. 2001.
- LUTHER, H. E. An alphabetical list of Bromeliad Binomials, 10<sup>th</sup> ed. **The Bromeliad Society International**, Sarasota. 2006.
- MARTIN, C.; IRIONDO, J. M.; GONZALES-BENITO, E.; PEREZ, C. The use of tissue culture techniques in the conservation of plant biodiversity. *Agro Food Industry Hi-Tech*, Milan, v. 9, n. 1, p. 37-40, 1998.
- MARTINELLI, G. Manejo de populações e comunidades vegetais: um estudo de caso na conservação de Bromeliaceae. In: Rocha, F. D.; Bergallo, H. G.; Sluys, M. V. &

- ALVES, M. A. S. (eds). **Biologia da Conservação: Essências**. Ed. Rima, São Paulo. Pp. 479-503, 2006.
- 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* 59 (1): 209 - 258. 2008.
- MELO, T. B. de. As bromélias no paisagismo. **Bromélia**, n 1, v. 3, p. 3-7, 1996.
- MENDES, R.; GOES, M.D. **Cultura de Tecido na Conservação de Germoplasma Vegetal**. DIALOGO XLV. Conservação de Germoplasma Vegetal. Montevideu: IICA / PROCISUR. 163 p.1996.
- MERCIER, H.; GUERREIRO FILHO, O. Sexual propagation of some native bromeliads of Mata Atlântica: effect of light and temperature on germination. **Hoehnea**, v.17, p.19-26, 1990.
- MOREIRA, B. A.; WANDERLEY, M. G.; BARROS, M. A. V. C. **Bromélias: importância ecológica e diversidade**. Taxonomia e morfologia – Curso de Capacitação de Monitores. São Paulo: Instituto de Botânica, p.12, 2006.
- MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 68f. (Dissertação Mestrado) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2008.
- MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D.; BASTOS, L. P.; ROCHA, M. A. C. Germinação de sementes *in vitro* de espécies de bromélias ameaçadas de extinção. **Magistra**, Cruz das Almas - BA, v. 20, n. 4, p. 321-327. 2008.
- PAIVA, P. D. O.; MAYER, M. B. D.; CAMPOS, R. J. C.; RODRIGUES, V. A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de glóxinia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.
- PAULA, C.C. Cultivo de Bromélias. Editora Visoca: Aprenda Fácil, 139p. il. 2000.
- PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. Cultivo Prático de Bromélias. Viçosa: UFV, 116 p. 2004.
- RABELO, J. A. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/>> Consultado em (16/07/2009).
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation** 14: 1799–1808. 2005.
- REITZ, R. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí, parte 1 fasc. Brom, p. 1-518, 1983.

- RIZZINI, C.T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Rio de Janeiro. 2ª ed. Âmbito Cultural Edições Ltda. 747p. 1997.
- 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** 4: 7-10. 1997.
- SARASAN, V. R.; CRIPPS, M. M.; RAMSAY, C.; ATHERTON, M.; MCMICHEN, G.; PRENDERGAST, J. K. Rowntree. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In vitro Cell. Devel. Biol. – 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. Pitcairnoideae (Bromeliaceae). **Flora. Neotropica. Monagr.** 14 (1): 1-658. The New York Botanical Garden, New York. 1974.
- SUPERITERESANTE. **Revista Superinteressante**. Ed. 145. Out. 1999.<[http://super.abril.com.br/superarquivo/1999/conteúdo\\_101607.shtml](http://super.abril.com.br/superarquivo/1999/conteúdo_101607.shtml)> Acesso em 16 de agosto de 2009.
- WANDERLEY, M. G. L. & MOLLO, L. Bromeliaceae. In: M. M. F. MELO; F. BARROS; M. G. L. WANDERLEY; M. KIRUZAWA; M. KIRUZAWA; S. L. JUNG- MENAÇOLLI; S. A. C. CHIEA (eds.). Flora Fanerogâmica da Ilha do Carodoso (São Paulo, Brasil). **Instituto de Botânica (3)**: 90-140. 1992.
- WENDT, T. **Hibridização e isolamento reprodutivo em Pitcairnia (Bromeliaceae)**. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 141p. 1999.
- VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Integrated management system for pineapple Fusarium disease control. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 334, p. 439-454, 1993.
- 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.
- 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**. Brasília : EMBRAPA, vol 1, p.297-330. 1998.

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

ZORNIG, R. K. Micropropagação de bromélias. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, 1996, v.3, n.3, p.3-8.

# CAPÍTULO 1

## PRODUÇÃO DE MUDAS DE BROMELIACEAE *IN VITRO*.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Artigo ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*



## PRODUÇÃO DE MUDAS DE BROMELIACEAS *IN VITRO*.

**Resumo:** O trabalho teve como objetivo estudar o efeito da benzilaminopurina (BAP) na produção de mudas *in vitro* de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*. Segmentos do talo, de plântulas germinadas *in vitro* foram incubados em meio de cultura MS suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP). Foram realizados cinco subcultivos em intervalos de 45 dias, totalizando de 225 dias de cultivo. Os resultados demonstram que as melhores médias de brotos/explante, independente das espécies estudadas, ocorreram no tratamento que continha 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de (ANA) demonstrando a viabilidade da técnica de micropropagação para a produção de mudas *in vitro* das espécies em estudo.

**Palavras-chave:** Multiplicação, BAP, ornamentais.

## PRODUCTION OF SEEDLINGS *IN VITRO* BROMELIADS.

**Abstract:** The study aimed to investigate the effect of benzylaminopurine (BAP) in the production of seedlings *in vitro* *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* LBSm and *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*. Stem segments, seedlings germinated *in vitro* were incubated in MS medium supplemented with 30g.L<sup>-1</sup> sucrose, 2g.L<sup>-1</sup> Phytigel<sup>®</sup>, 0.5mg.L<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.0, 2.0, 4.0 and 6.0 mg.L<sup>-1</sup> of benzylaminopurine (BAP). Five subcultures were performed every 45 days, totaling 225 days of cultivation. The results show that the best mean shoots/explant, regardless of species, occurred in the treatment containing 2.0 mg.L<sup>-1</sup> BAP and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> ANA demonstrating the feasibility of the technique micropropagation for the production of *in vitro* seedlings of the species studied.

**Keywords:** Multiplication, BAP, ornamental.

## INTRODUÇÃO

O bioma da Mata Atlântica contém alta diversidade genética de espécies endêmicas. Inventários florísticos em diversos trechos do domínio Atlântico vêm apontando Bromeliaceae entre as famílias de maior riqueza e diversidade tanto genérica, quanto específica (ARAÚJO, 2000; COSTA; DIAS, 2001; MAMEDE et al. 2001; ASSIS et al. 2004; AMORIM et al. 2005; MARTINELLI, 2006). Por outro lado, são os estados da Região Sudeste e o sul da Bahia que abrigam uma grande diversidade de espécies de bromélias ficando evidente que esta região é o principal centro de diversidade e endemismo da família (MARTINELLI, 1988).

Dentre dos táxons de Bromeliaceae ocorrentes na Mata Atlântica encontram-se a *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, vulneráveis a extinção, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catinae*, criticamente ameaçada de extinção.

A comercialização de bromélias se dá, prioritariamente, por seu uso ornamental, constituindo-se em atividade fortemente extrativista. A falta de um sistema de produção, aliada à demanda que existe para o comércio dessas plantas, leva pequenos agricultores inseridos em comunidades de baixa renda que têm neste produto uma alternativa de incremento de renda (ADAMI, 2001; ANACLETO, 2001) a exercer tal atividade, ampliando desta forma a pressão extrativista, e colocando várias espécies na condição de ameaçada.

A produção de mudas para atender ao mercado seria uma estratégia para reduzir o extrativismo predatório, além de regularizar essa cadeia e garantir a demanda (SILVEIRA, 2009). Entretanto a propagação das bromélias é lenta, e geralmente após a floração, apenas uma muda é produzida por planta (HOSOKI ASAHIRA, 1980).

Em vista disso, a cultura de tecidos, com suas inúmeras técnicas, pode ser uma alternativa na solução desse problema, visto que a micropropagação permite a produção de um elevado número de mudas, em curto espaço de tempo e ocupando espaço significativamente reduzido.

A micropropagação de bromélias tem sido considerada uma importante técnica para otimizar a produção dessas plantas de modo a atender o mercado de ornamentais, e já vem sendo relatada com êxito. Vários estudos têm sido realizados visando o cultivo *in vitro* de bromélias de interesse comercial e também das

bromélias endêmicas, raras e/ou ameaçadas de extinção (ARRABAL et al. 2002; RODRIGUES et al. 2004; RECH-FILHO et al. 2005; MERCIER; NIEVOLA, 2003; MOREIRA, 2008 e MOREIRA et al. 2008; SILVEIRA et al. 2009).

Diversas espécies de bromélias são micropropagadas a partir de sementes como *Pticaoia flamma*, *Vriesea fosteriana* e *Tillandsia pohliana* (NIEVOLA et al. 2001), *Vriesea reitzii* (RECH-FILHO et al. 2005), *Tillandsia eizii* (PICKENS et al. 2003 e PICKENS et al. 2006), *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis* (BELLINTANI et al. 2007). Quando o objetivo, além da propagação, é a preservação do patrimônio genético de uma dada espécie, a micropropagação deve ser iniciada por meio da germinação *in vitro* de sementes, coletadas de diferentes populações. Esse procedimento impede a clonagem de espécies ainda pouco estudadas evitando uma erosão genética significativa sobre esse germoplasma, visto que cada semente será uma matriz (SILVEIRA, 2009).

Para a adequação do protocolo são necessários estudos que garantam ajustes em todas as etapas e considerando os diferentes fatores que podem afetar a eficiência do sistema. De acordo com Caldas et al. (1998) dentre esses fatores, o meio de cultivo está entre os mais relevantes, destacando-se, nos itens que o compõem, os reguladores vegetais, substâncias determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. 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. As citocininas são importantes na indução de brotações laterais, mobilização de nutrientes e juntamente com auxina atuam na morfogênese *in vitro*. A necessidade de adequação fica evidente nos resultados obtidos para diferentes espécies de plantas da família bromeliácea, como *Dyckia distachya*, (POMPELLI; GUERRA 2005), *Aechmea blanchetiana* (GALVANESE et al., 2007), *Neoglaziovia variegata* (SILVEIRA et al., 2009); espécies do gênero *Ananas* (BORGES et al., 2003; CARVALHO et al., 2005; PASQUAL et al., 2008; SOUZA et al., 2009).

Considerando a importância das Bromeliaceae no cenário nacional, bem como da conservação da biodiversidade e a necessidade de desenvolver protocolos de propagação, o trabalho teve como objetivo estudar o efeito da benzilaminopurina (BAP) na produção de mudas *in vitro* de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var.

*bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

### **Estabelecimento do cultivo *in vitro* a partir de sementes**

Foram utilizadas sementes retiradas de frutos maduros de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*. Inicialmente as sementes foram lavadas em água corrente e desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial 2,5% de cloro ativo) e água destilada, na proporção 2:1, durante 20 minutos e lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada.

As sementes foram incubadas em frascos de vidro (100 x 70 mm) contendo 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, (Figura 1) sendo o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 22 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h luz dia<sup>-1</sup> onde permaneceram por aproximadamente de 60 dias.

### **Multiplicação *in vitro* a partir de segmentos do talo**

Segmentos do talo, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento, das plântulas germinadas *in vitro* (Figura 1E, 1F e 1G) foram incubados em frasco (100 x 70 mm) contendo 25 mL do meio de cultura MS acrescido com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, suplementado com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 (utilizando-se KOH ou HCl 0,1 N), antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 20 minutos. As culturas foram

mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo 16 h luz  $\text{dia}^{-1}$  e densidade de fluxo de fótons  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Foram realizados cinco subcultivos em intervalos de 45 dias, totalizando de 225 dias de cultivo. As variáveis medidas para avaliação do crescimento e desenvolvimento dessas plantas nos diferentes meios foram: a) número de brotos/explante, b) altura das brotações e c) número de raízes e d) número de brotações.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de 4 X 4 (quatro espécies x quatro concentrações de BAP) sendo cada tratamento constituído de 4 repetições. A unidade experimental constituiu-se de 4 explante por frasco. Para a comparação de médias foi empregado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2000).

Visando o atendimento das pressuposições da análise de variância, as médias para as variáveis, número de raízes e comprimento das brotações foram transformadas para  $\sqrt{y + 0,5}$  - SQRT (Y + 0,5).

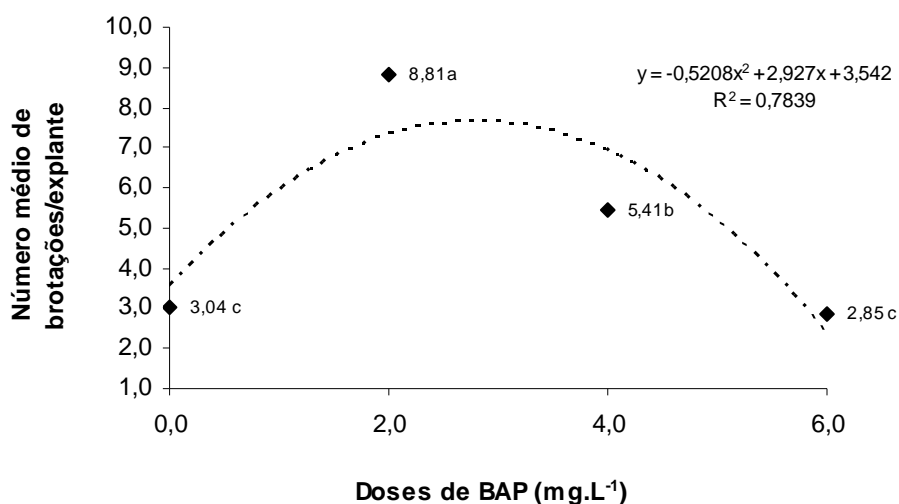
### **Aclimatização**

Plantas enraizadas, oriundas da multiplicação *in vitro*, com aproximadamente 120 dias de idade foram transplantadas para foram retiradas dos frascos e tiveram suas raízes lavadas em água corrente para a remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, foram transferidas para copos plásticos de 300 mL, devidamente perfurados, para drenagem do excesso de água, contendo como substrato terra vegetal. Ao final de 30 dias foram observados a sobrevivência das plantas, sua morfologia e desenvolvimento de parte aérea.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

No estabelecimento do cultivo *in vitro* a partir de sementes verifica-se que a porcentagem de germinação foi de 100%, independente da espécie, aos 60 dias de cultivo (dados não apresentados). Estes resultados são similares aos encontrados na literatura para outras espécies de bromélias (DROSTE et al., 2005; GALVANESE et al., 2007).

O número de brotos emitidos, a partir de segmentos do talo, independente da espécie, foi influenciado pelas doses do regulador vegetal BAP. Verifica-se que a concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> proporcionou os melhores resultados com a formação de 8,81 brotações por explante, aos 255 dias de cultivo (Figura 1) a partir da qual houve diminuição na emissão do número de brotações, sendo 78% da variância, explicada pelo modelo quadrático da regressão. A dose de aproximadamente 6,0 mg L<sup>-1</sup> comprometeu significativamente a morfogênese e proporciona oxidação dos explantes, sugerindo efeito fitotóxico (Figura 2).



**Figura 1** Efeito do BAP no número de brotações por explante independente da espécie estudada. Cruz das Almas - BA, 2010.



**Figura 2** Oxidação em explantes oriundos do meio de cultura MS acrescido com 6,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (A-B). Cruz das Almas - BA, 2010.

Diversos autores propõem a utilização do BAP em combinação com o ANA para a indução brotações, levando a alta taxa de multiplicação, em espécies da família

Bromeliaceae. Pompelli e Guerra (2005), estudando a micropropagação de *Dyckia*, observaram maiores taxas de regeneração no meio MS líquido suplementado com NAA (2  $\mu\text{M}$ ), BA (4  $\mu\text{M}$ ) e PBZ (6  $\mu\text{M}$ ), resultando na indução de 133,58 brotos/planta após 142 dias de cultivo. Galvanese et. al (2007) observaram que a combinação de 6,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP com 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA, em Meio MS semi-sólido, proporcionou um número médio de 62 brotações por explante aos 180 dias de cultivo, em plantas de *Aechmea blanchetiana*. Borges et al. (2003), em estudo com *Ananas lucidus* Miller, utilizaram gemas axilares para indução de brotações em meio MS acrescido de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP e 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA conseguindo 32,6 brotos/explante; Carvalho et al. (2009) estudando a micropropagação de abacaxi ornamental obtiveram uma maior formação brotações (3,75 brotos/explante) quando se utilizou 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP; Pasqual et al. (2008) obteve em média 21 brotações por explante em *Ananas comosus* var. *erectifolius* ao utilizar 1,5  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP.

Avaliando o comportamento das diferentes espécies e considerando os gêneros, verifica-se que o gênero *Aechmea* é o que melhor responde às condições de cultivo estabelecidas, quando comparado com o gênero *Hohenbergia*. Dentre as espécies observa-se que a *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* apresenta maior capacidade responsiva, seguida da *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*. A *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, são as que apresentam os menores resultados, com 3,99 e 3,62 brotações por explante respectivamente (Tabela 1 e Figura 3).



**Tabela 1.** Número médio de brotações por explante em diferentes concentrações de BAP ao longo de 225 dias, em espécies de bromeliáceas. Cruz das Almas - BA, 2010.

Espécies	Concentrações de BAP (mg. L <sup>-1</sup> )				Média
	0,00	2,00	4,00	6,00	
<i>Aechmea bromeliifolia</i> var. <i>bromeliifolia</i>	3,89bC	8,83bA	5,24bB	3,54bC	<b>5,37B</b>
<i>Aechmea distichantha</i> Lem. var. <i>distichantha</i>	5,70aC	11,18aA	7,56aB	4,64aD	<b>7,27A</b>
<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm	1,46cD	8,04cA	4,39cB	2,07cC	<b>3,99C</b>
<i>Hohenbergia catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>	1,10cC	7,19dA	4,47cB	1,72dC	<b>3,62C</b>
<b>Média</b>	<b>3,04c</b>	<b>8,81a</b>	<b>5,41b</b>	<b>2,85c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>18,06</b>				

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.



**Figura 3.** Brotações de *Aechmea bromeliifolia* (a), *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* (b), *Aechmea multiflora* (c) e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* (d), em meio de cultura MS suplementado com BAP (2,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA). Cruz das Almas - BA, 2010.

Resultados semelhantes foram obtidos por Aranda-Peres (2005) na regeneração de plantas do gênero *Aechmea* utilizando 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Na micropropagação do abacaxizeiro e com essa mesma concentração Barboza et al. (2004) obtiveram uma taxa de multiplicação de 6,4 brotos/explante enquanto Canto (2004) obteve bons resultados em concentrações que variaram de 1,0 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Já Fráguas et al. (2009) obtiveram em média 2,24 brotações por explantes, para a cultivar de abacaxizeiro IAC 'Gomo-de-mel', ao utilizarem 1,0 mg L<sup>-1</sup> dessa citocinina, deixando clara a diferença de resposta entre gêneros e dentro do mesmo gênero, entre espécies.

A determinação de uma concentração máxima vem sendo relatada em vários trabalhos, a partir da qual se observa um decréscimo no número de brotações, como o que foi observado nesse trabalho. Silva et al. (2002) observaram que a aplicação de BAP no meio de cultura para a multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro, aumentou o número total de brotos até a concentração máxima de 2,52 mg L<sup>-1</sup>, a partir da qual houve um efeito negativo. Santos et al. (2008) verificaram que a concentração de BAP superior a 1,2 mg L<sup>-1</sup> reduziria o número de brotações de *Ananas comosus* var. *bracteatus* em todos os períodos de subcultivo. O efeito negativo se dá, provavelmente, pela fitotoxicidade causada pelo regulador de crescimento e, portanto, o ajuste dos protocolos deve buscar menores concentrações (GUEVARA, 1987; RECH FILHO et al., 2005).

Por outro lado, apesar da dose de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionar a indução de maior número de brotações, no presente trabalho, estas se apresentam unidas entre si, independente da espécie, dificultando o processo de individualização (Figura 4). Estes resultados sugerem que tratamentos com concentrações ainda menores (0 a 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) podem ser mais indicados, facilitando assim, a individualização dos brotos. De acordo com Macêdo et al. (2003), tratamentos em concentrações menores de BAP são os mais indicados para serem adicionados ao meio de cultura devido à maior facilidade de individualização dos brotos.

No período dos subcultivos pôde-se observar um incremento no número de brotações até o quarto subcultivo, nas espécies estudadas. Verifica-se que a *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* e *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia* apresentam maior número de brotações por explante ao longo dos subcultivos realizados (Tabela 2).

As brotações mais altas são observadas no tratamento sem a adição do regulador vegetal (Figura 5), havendo diferença significativa, em relação aos demais tratamentos, ao longo dos cinco subcultivos independentemente da espécie.

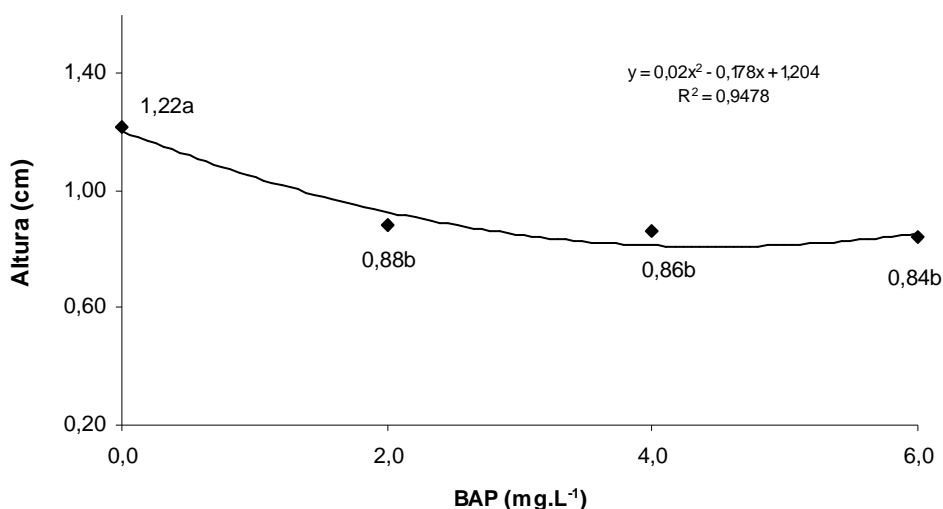


**Figura 4.** Massa de Brotações (A) e brotos individualizados (B) de *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* provenientes do tratamento MS com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Cruz das Almas - BA, 2010.

**Tabela 2.** Número médio de brotações por explante, ao longo de cinco subcultivos em diferentes espécies de Bromeliaceae, independente da concentração de BAP. Cruz das Almas - BA, 2010.

Espécies	Subcultivos (a cada 45 dias)					Média
	1º	2º	3º	4º	5º	
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker var. <i>bromeliifolia</i>	2,60bC	4,35bB	6,24bA	7,11bA	6,57bA	<b>5,37B</b>
<i>Aechmea distichantha</i> Lem. var. <i>distichantha</i>	3,65aC	5,60aB	8,74aA	9,47aA	8,89aA	<b>7,27A</b>
<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm	2,22bcD	3,55bcC	5,00cAB	5,04cA	4,14cBC	<b>3,99C</b>
<i>Hohenbergia catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>	1,50cC	3,13cB	4,11dA	4,57cA	4,09cA	<b>3,48D</b>
<b>Média</b>	<b>2,50d</b>	<b>4,16c</b>	<b>6,03b</b>	<b>6,55a</b>	<b>5,93b</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>18,06</b>					

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.



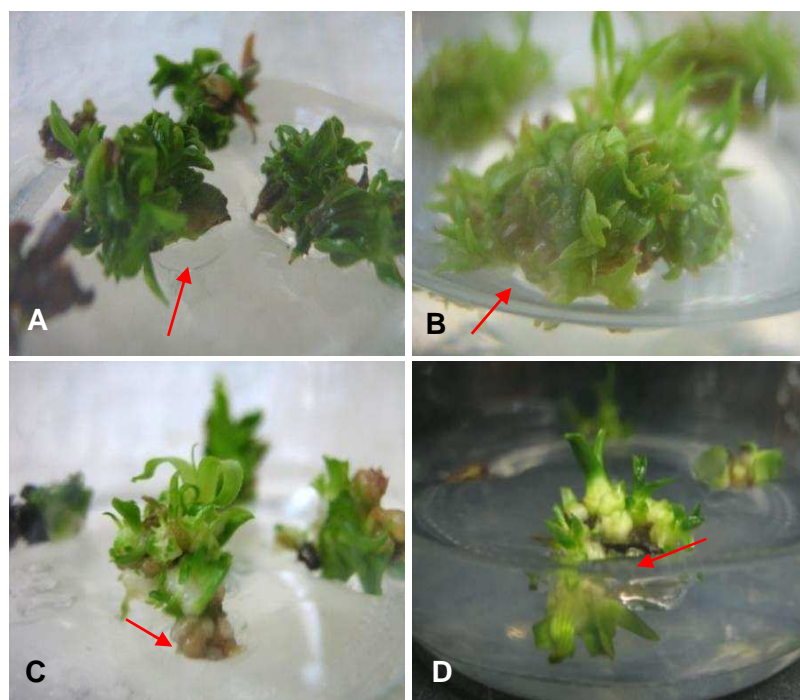
**Figura 5.** Efeito do BAP na altura média das brotações independente do subcultivo e espécie de Bromeliaceae estudados. Cruz das Almas - BA, 2010.

Níveis menores ou a ausência do BAP promovem o crescimento/alongamento dos brotos (MOK et al., 2000; DAL VESCO, et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2002). 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 *Annanas erectifolius*. Silveira et al. (2009) observaram resultado similar com Caroá, quando o meio de cultivo adicionado de BAP promoveu maior número de brotações, entretanto os brotos eram pequenos e poucas eram as raízes formadas.

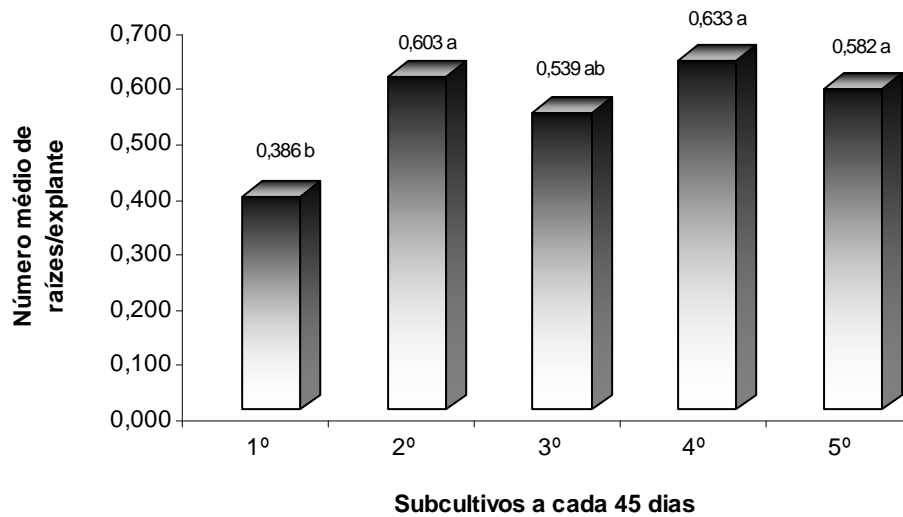
Essa redução na formação de raízes também foi observada nesse trabalho, independente das espécies avaliadas (Figuras 6 e 7). Este dado revela a forte ação do BAP na indução das brotações laterais e um balanço auxina/citocinina insuficiente para promover a formação satisfatória de raízes juntamente com a formação de brotos. Contudo, as maiores médias para esta variável ocorreram no 2º, 3º, 4º e 5º subcultivo (Figura 8).

Christianson e Warnick (1985) relataram que a organogênese pode ser dividida em três fases: a) aquisição da competência, como habilidade das células em responder a um estímulo, b) indução da organogênese, durante a qual as células tornam determinadas para formação de órgãos e c) diferenciação e desenvolvimento

morfológico, resultando na formação de brotos e raízes. Estes autores foram os primeiros a demonstrar que o controle da organogênese está relacionado com o balanço exógeno dos reguladores vegetais para indução de cada fase.



**Figura 6.** Brotações que não formaram raízes em meio MS com 4,0 ou 6,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia* (A), *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* (B), *Aechmea multiflora* L.B.Sm (C) e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* (D). Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 7.** Número médio de raízes por explante, por subcultivo a cada 45 dias, em genótipos de Bromeliaceae. Cruz das Almas - BA, 2010.

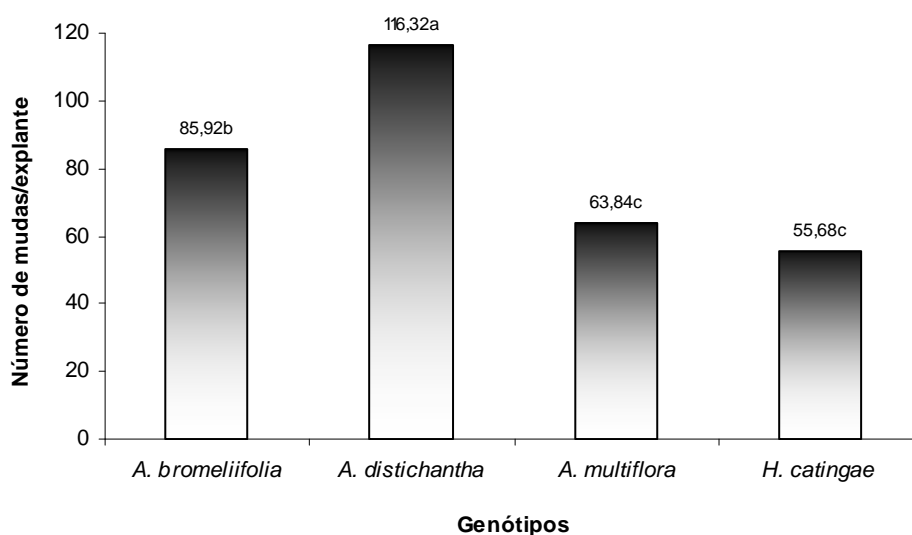
Entretanto, a transferência dos brotos para meio MS básico após, em média, 90 dias de cultivo proporcionou enraizamento dos brotos com eficiência e sem maiores dificuldades.

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) e Figueiredo (2003) obtiveram resultados semelhantes em abacaxizeiro 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 uma redução no número de raízes. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) o BAP tem sido eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece responsável pela multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de ser a citocinina de menor custo.

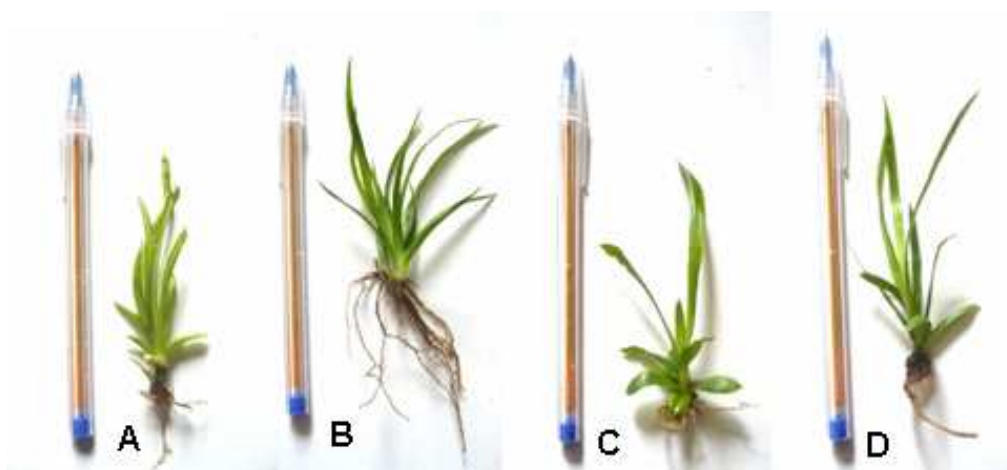
As diferentes respostas morfogênicas *in vitro* com relação ao número e altura das brotações assim como número de raízes, sugerem que as espécies apresentam exigências específicas no processo morfogênico. Guerra et al. (1999) e Barboza et al. (2004) estudando a micropropagação do abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merr. e, do híbrido PExSC-52 e da cultivar *Smooth Cayenne* constataram variações na taxa de regeneração, as quais atribuíram a diferenças entre os genótipos.

Considerando que foram incubados 16 explantes por espécie, o número total de mudas obtidas ao final do quinto subcultivo para *Aechmea bromeliifolia* (Rudge)

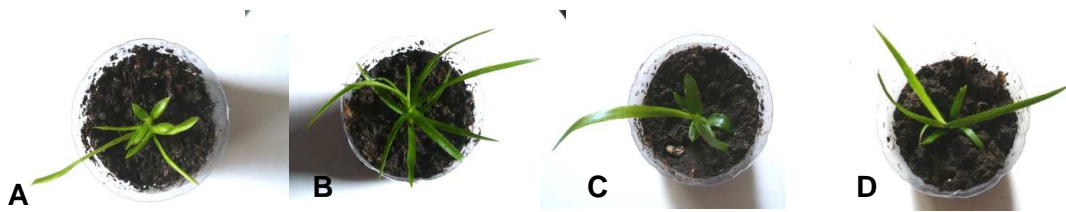
Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* foram, respectivamente, 85,92; 116,32; 63,84 e 55,68 (Figura 8), portanto uma taxa de multiplicação de 1:5; 1:7, 1:4 e 1:3,5. As mudas apresentaram morfologia normal, com bom desenvolvimento de parte aérea (Figuras 9 e 10).



**Figura 8.** Número de mudas em 16 explantes ao final do quinto subcultivo em espécies de Bromeliaceae. Cruz das Almas - BA, 2010.



**Figura 9.** Aspecto das mudas produzidas *in vitro*. *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia* (A), *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* (B), *Aechmea multiflora* L.B.Sm (C) e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* (D). Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 10.** Mudanças aclimatizadas produzidas *in vitro*. *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia* (A), *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* (B), *Aechmea multiflora* L.B.Sm (C) e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* (D). Cruz das Almas – BA, 2010.

Ainda que o tratamento contendo  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP não seja o mais adequado para o processo da rizogênese e no incremento da altura das brotações para os genótipos em estudo, aos 255 dias de cultivo, este efeito torna-se pouco importante considerando que, na propagação das bromélias pelo método convencional, de um modo geral se obtém uma muda/planta. Considerando ainda que dentre as bromélias com baixa capacidade morfogênica está a *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, criticamente ameaçada de extinção a técnica pode ser uma ferramenta para conservação mantendo a diversidade genética das populações naturais.

## CONCLUSÕES

Os resultados destes experimentos demonstram a viabilidade da técnica de micropropagação para a produção de mudas *in vitro* das espécies *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* a partir de segmentos de talos cultivados na presença de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, o que pode resultar em um fornecimento de mudas para o mercado paisagístico e como suporte para a conservação destas espécies. Este protocolo de micropropagação também pode ser utilizado para o desenvolvimento de novos estudos com outras espécies de bromélias visando a propagação e conservação.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMI, R. Drama social na Pedra Branca do Araraquara. **Folha de Guaratuba**, Guaratuba. 13 de Abril de 2001.
- AMORIM, A. M. A.; FIASCHI, P.; JARDIM, J. G.; THOMAS, W. W.; CLIFTON, B. C.; CARVALHO, A. M. V. The vascular plants of a forest fragment in Southern Bahia, Brazil. **Sida**. 21(3): 1727-1757. 2005.
- 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.
- ARANDA-PERES, A. N. **Cultivo in vitro de Bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, Avaliação nutricional e substrato para aclimação**. 2005. 125f. (Tese de Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.
- ARAÚJO, D. S. D. 2000. **Análise florística e fitogeográfica das restingas do Rio de Janeiro**. 2000. 176 p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2000.
- ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation** 11: 1081-1089. 2002.
- ASSIS, A. M.; THOMAS, L.D.; PEREIRA, O. J. Florística de um trecho de floresta de restinga no Município de Guarapari, Espírito Santo, Brasil. **Acta Botânica Brasilica** 18(1): 191-201. 2004.
- BARBOZA, S. B. S. 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.
- BEN-JAACOV, J.; ACKERMAN, A.; TAL, E.; JACOBS, G. Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. **HortScience**, Alexandria, v.26, n.2, p. 74-75, 1991.
- BORGES, N. S. S.; CORREIA, D.; ROSSETTI, A.G. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas lucidus* Miller. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.9, p.37-44, 2003.

- CALDAS L. S.; HARIDASAN P; FERREIRA M. E. Meios nutritivos. In: TORRES A. C.; CALDAS L. S.; BUSO J. A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. p. 87-132. 1998.
- CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Implicações do paclobutrazol no crescimento *in vitro* de plantas de abacaxi na conservação de germoplasma. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 717-720, 2004.
- 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.
- COSTA; A. F.; DIAS, I. C. A. (orgs.). Flora do Parque Nacional da restinga de Jurubatiba e arredores, RJ: listagem, florística e fitogeografia (Angiospermas, Pteridófitas e Algas continentais). Museu Nacional/ UFRJ, Rio de Janeiro, 200p. 2001.
- CHRISTIANSON M. L, WARNICK D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Develop. Biol.** 112:494-497. 1985
- DAL VESCO, L. L. D.; NOVAES, A. L. T.; PINTO, T. H.; POMPELLI, M. F.; RIBEIRO, R. J.; GUERRA, M. P. Protocolo para a micropropagação de bromélias em biofábricas. **Anais... VII Congresso de Fisiologia Vegetal**, Ilhéus, 2001.
- DROSTE, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V. & ALMEIDA, J. W.. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 48(5): 717-722. 2005.
- FRÁGUAS, C. B.; DORNELLES, C. M. V.; LIMA G. PACE P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel' **Ciência Rural**, v.39, n.6, 2009.
- 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**. 54(311): 063-067, 2007.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI; Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.

- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p.1557-1563, 1999.
- GUEVARA, E. B. Reguladores de crescimento. In:\_\_\_\_\_. **II Curso de cultivo de tecidos**. [S.l.]: Turrialba,1987. p. 58-79.
- HOSOKI, T. & ASAHIRA, T. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience** 15(5): 603-604. 1980.
- MACÊDO, C. E. C.; SILVA, M. G.; NÓBREGA, F. S.; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. I. 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**, v.25, n.3, p.501-504, 2003.
- MAMEDE, M. C. H.; CORDEIRO, I.; ROSSI, L. Flora vascular da Serra da Juréia, Município de Iguape, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**.15: 63-124. 2001.
- MARTINELLI, G. Padrões fitogeográficos em Bromeliaceae dos campos de altitude da floresta pluvial tropical costeira do Brasil no estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia** 66(40): 3-10. 1988.
- MARTINELLI, G. Manejo de populações e comunidades vegetais: um estudo de caso na conservação de Bromeliaceae. In: ROCHA, F. D.; BERGALLO, H. G.; SLUYS, M. V.; ALVES, M. A. S. (eds). **Biologia da Conservação: Essências**. Ed. Rima, São Paulo. Pp. 479-503. 2006.
- MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélia *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia** 1(1): 57-62. 2003.
- MOK, M.C.; MARTIN, R.C.; MOK, D.W.S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v.36, p.102-107; 2000.
- MOREIRA M. A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merrill cv. Pérola**. 81p. 2001. (Tese doutorado). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2001.
- MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 68f. (Dissertação Mestrado) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2008.

- MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D.; BASTOS, L. P.; ROCHA, M. A. C. Germinação de sementes *in vitro* de espécies de bromélias ameaçadas de extinção. **Magistra**, Cruz das Almas - BA, v. 20, n. 4, p. 321-327, out./dez., 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497,1962.
- MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Revista Vidália**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 57-62, 2003.
- NIEVOLA, C. C., MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. Urea – A possible source of organic nitrogen for tank bromeliads. **Bromelia** 6 (1-4): 44-48. 2001.
- 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 set. 2009.
- PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**. vol. 26, n<sup>o</sup>1, Brasília. 2008.
- PICKENS, K. A., AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. **HortScience** 38 (1): 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* 42: 348-353. 2006.
- POMPELLI M. F; GUERRA M. P Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5:117- 124.2005.
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation** 14: 1799–1808. 2005.
- RODRIGUES, T. M.; PAIVA, P. D. O.; RODRIGUES, C. R.; CARVALHO, J. G.; FERREIRA, C. A.; PAIVA, R. Desenvolvimento de mudas de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis* Rarms) em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 757-763, 2004.
- SANTOS, M. D. M.; RIBEIRO, D. G.; TORRES, A. C. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e

períodos de subcultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n.9, p.1115-1120, 2008.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT User's Guide. v. 8.0. Vol. I. Cary NC: SAS Institute, Inc., 2000.

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. R.; SOUZA, A. S.; LEDO C. A. S.; SANTANA, J R. F. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian archives of biology and technology** [on-line]. 2009, vol.52, n.4, pp.923-932.

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.

SOUZA, F. V. D. ; CABRAL, J. R. S. ; FERREIRA, F. R. ; SOUZA, E. H. ; SILVA, M. J. Evaluation of F1 hybrids between *Ananas omosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 79-84, 2009.

## CAPÍTULO 2

### EFEITO DA SACAROSE E DO MANITOL NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* PARA O CRESCIMENTO MÍNIMO EM BROMELIACEAE<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Biodiversity and Conservation.

## **EFEITO DA SACAROSE E DO MANITOL NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* PARA O CRESCIMENTO MÍNIMO EM BROMELIACEAE**

**Resumo:** O objetivo desse estudo foi o estabelecimento de uma metodologia para a conservação *in vitro* de plantas de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* pela estratégia de crescimento mínimo a fim de contribuir no desenvolvimento de protocolos para a formação de futuros bancos de germoplasma. Plântulas com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, germinadas *in vitro*, foram incubadas em meio de cultura MS e ½ MS, acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e 30 g.L<sup>-1</sup>, 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ou manitol e a combinação de 30 g.L<sup>-1</sup> da sacarose com 15 g.L<sup>-1</sup> do manitol, onde permaneceram por doze meses. Os resultados obtidos demonstram ser viável a técnica de manutenção sob condição de crescimento mínimo *in vitro* das espécies em estudo por 360 dias em meio ½ Ms contendo 15 g.L<sup>-1</sup> de manitol sem comprometer a fase de recuperação do material conservado, fato este que é de suma importância em um protocolo para manutenção de germoplasma sob crescimento mínimo.

**Palavras-chave:** Germoplasma, reguladores osmóticos, recursos genéticos.

## EFFECT OF SUCROSE AND MANNITOL IN STORAGE FOR *IN VITRO* GROWTH IN MINIMUM BROMELIACEAE

**Abstract:** The aim of this study was to develop a methodology for *in vitro* conservation of plant *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* LBSm and *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* the minimum growth strategy in order to contribute to the development of protocols for the training of future germplasm banks. Seedlings with about 1.0 cm long, germinated *in vitro* were incubated in culture medium MS and ½ MS plus 2 g L<sup>-1</sup> Phytigel® and 30 gL<sup>-1</sup>, 15 gL<sup>-1</sup> sucrose or manitol and combination of 30 gL<sup>-1</sup> sucrose with 15 gL<sup>-1</sup> of manitol, where they remained for twelve months. The results demonstrate the viability of technical maintenance provided minimal growth *in vitro* study of the species for 360 days in medium ½ MS containing 15 gL<sup>-1</sup> of manitol without compromising the recovery phase of the preserved material, a fact which is of paramount importance in a protocol for maintenance of germplasm under minimal growth.

**Keywords:** Germplasm, osmotic regulators, genetic resources.



## INTRODUÇÃO

Devido ao seu valor ornamental, varias espécies de Bromeliaceae sofrem ação humana extrativista e predatória em seus habitats naturais e encontram-se ameaçadas de extinção. Esta ação predatória, associada à redução e fragmentação da Floresta Atlântica, que é considerada um centro evolutivo dessas espécies (MARTINELLI, 1994), sem a reposição natural dos exemplares nas florestas, provoca grandes danos ambientais, entre estes a redução da diversidade específica.

De acordo com Martinelli (2008) a família Bromeliaceae é um dos grupos taxonômicos mais relevantes, devido ao alto grau de endemismo e expressivo valor ecológico decorrente principalmente de sua interação com a fauna. O Brasil possui a maior variabilidade genética desta família, que vegeta em lugares muito úmidos, tais como o ecossistema Mata Atlântica (REITZ, 1983) e mesmo em regiões muito áridas, como a Caatinga (ANDRADE-LIMA, 1981; XAVIER, 1982).

Diversas espécies dessa família encontram-se ameaçadas de entrar em processo de extinção, dentre estas a *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, vulneráveis a extinção, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, criticamente ameaçada de extinção.

A conservação dos recursos genéticos vegetais, frente ao atual cenário de destruição ambiental, é hoje uma demanda de interesse global e segundo Amaral (2005) é imprescindível priorizar estratégias para preservar os recursos genéticos, bem como pesquisar novas técnicas de conservação, especialmente para as espécies nativas.

A preocupação com a extinção tem levado a pesquisas sobre protocolos de propagação e conservação de diversas espécies. A conservação de germoplasma, de acordo com Mendes e Góes (1996), pode consistir na manutenção de coleções nos seus próprios locais de ocorrência, nesse caso chamada de conservação *in situ*. Também é possível preservar os recursos genéticos (na forma de embriões, sementes, explantes e indivíduos) por meio da conservação *ex situ*, isto é, em locais e condições distintas aos de ocorrência natural. A conservação *ex situ*, dependendo da espécie em questão, pode preservar o germoplasma em casas de vegetação, câmaras de baixa temperatura ou secas e cultivo a campo. Tais coleções também podem ser introduzidas por meio da cultura de tecidos (conservação *in vitro*), a partir

de diferentes explantes ou serem criopreservadas. As coleções conservadas *in vitro* são estabelecidas usualmente a partir da germinação de sementes ou por cultura de gemas e ápices caulinares, sendo mantidas em condições assépticas.

A possibilidade da utilização dos métodos de conservação *in vitro* é atrativa tanto por motivos econômicos quanto práticos, sendo um componente adicional importante do tratamento de recursos genéticos (WITHERS; WILLIAMS, 1998). O emprego das técnicas de cultura *in vitro* é de grande interesse para a conservação de germoplasma de espécies com sementes recalcitrantes, de espécies que se propagam vegetativamente, bem como de espécies em extinção, genótipos elite e material geneticamente modificado (ROCA et al., 1991; ENGELMAN, 1998).

O processo de conservação *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma no campo, e dentre elas destacam-se a necessidade de menor espaço para ocupação do material; manutenção de material vegetal livre de patógenos; disponibilidade de material para ser imediatamente propagado, e tem o objetivo de reduzir ou até suprimir o crescimento das células e tecidos, diminuindo drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade (DORION et al., 1991; WITHERS; WILLIAMS, 1998) aumentando ao máximo o intervalo entre os subcultivos, reduzindo-se assim a mão-de-obra e o espaço necessários para a sua conservação.

Entre as técnicas mais utilizadas para reduzir o crescimento *in vitro* encontra-se a redução da temperatura de incubação e a aplicação de agentes osmóticos e hormonais ao meio nutritivo (CONCEIÇÃO et al., 1998; MARTIN et al., 1998; GOLMIRZAI; TOLEDO, 1999). Outro procedimento indicado para o mesmo objetivo é o de diminuir a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura.

Os agentes osmóticos, tais como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993). Todavia, vale salientar que essas técnicas, ao estender o intervalo entre os subcultivos, não devem comprometer a qualidade e viabilidade dos explantes.

A redução da temperatura nas salas de crescimento, aliada a diminuição na concentração dos macronutrientes e micronutrientes e da concentração de sacarose do meio de cultura, têm sido estratégias que, ao serem aplicadas conjuntamente,

vem obtendo sucesso no estabelecimento de condições favoráveis a conservação *in vitro* em algumas culturas, podemos citar como exemplo a cana de açúcar (LEMOS et al., 2002), o maracujazeiro (FARIA et al. 2006), o abacaxizeiro (BALZON et al., 2008) e também Bromeliaceae (MOREIRA, 2008).

O desenvolvimento de pesquisas para conservação do germoplasma brasileiro, principalmente de espécies endêmicas como as da família Bromeliaceae, constitui uma estratégia relevante e oportuna para atenuar o problema da exploração excessiva dos recursos genéticos nacionais. Objetivando colaborar para a solução desse problema, foi pesquisado nesse trabalho o estabelecimento de uma metodologia para a conservação *in vitro* de plantas de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* pela estratégia de crescimento mínimo a fim de contribuir no desenvolvimento de protocolos para a formação de futuros bancos de germoplasma.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

### Conservação *in vitro*

Sementes retiradas de frutos maduros foram lavadas em água corrente e em seguida desinfestadas com imersão em álcool 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial 2,5% de cloro ativo) e água destilada (2:1) por 20 minutos, seguida de três lavagens em água estéril (destilada e autoclavada) na câmara de fluxo laminar. Uma vez desinfestadas as sementes foram incubadas em fracos de vidro (100 x 70 mm) com 25mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose, e solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, sendo o pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem. As sementes foram incubadas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 22 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h luz dia<sup>-1</sup>.

Plântulas com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, provenientes da germinação *in vitro*, foram incubadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura MS e MS com metade da concentração dos sais solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e suplementado com 30 g L<sup>-1</sup>, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose ou manitol e a combinação de 30 g L<sup>-1</sup> da sacarose com 15 g L<sup>-1</sup> do manitol, onde permaneceram por doze meses. As condições de cultivo foram: temperatura de 21 ± 2°C em condição luminosa de 22 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 12 h luz dia<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições, sendo um explante por cada tubo. A cada 60 dias foi avaliado o comprimento da parte aérea (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 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).

Aos 360 dias foi medida a relação raiz/parte aérea (mensurado pelo quociente entre matéria do sistema radicular seco e parte aérea seca). Para a análise da matéria seca as plantas foram retiradas do tubo com meio de cultura, mergulhada três vezes em água destilada. Após o enxágue separou-se a parte aérea e sistema radicular, pesou-se em balança analítica e em seguida acondicionou-se a parte aérea e sistema radicular separadamente em sacos de papel 'Kraft' sendo estes secos em estufa dotada de sistema com circulação forçada e renovação de ar, na temperatura de 70° ± 3°C, até atingir massa constante.

Para a comparação de médias foi empregado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE INC, 2000). Para a variável número médio de folhas senescentes as médias foram transformadas para - SQRT (Y + 0,5) visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

### **Regeneração *in vitro* utilizando o benzilaminopurina (BAP)**

Segmentos do talo das plantas provenientes dos meios de conservação após 360 dias de cultivo foram incubadas em meio de cultura MS, com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido

naftalenoacético) e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (benzilaminopurina). Foram colocados 1 explante por tubo (25 x 150 mm) com 10 mL do meio de cultura.

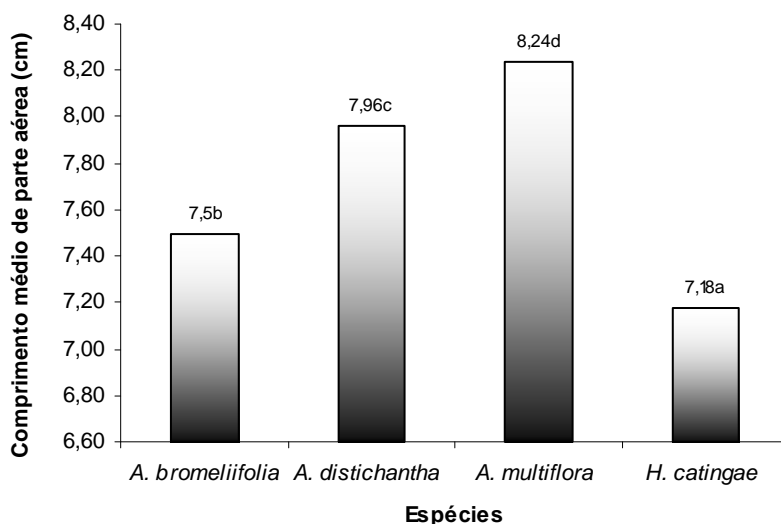
O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  (utilizando-se KOH ou HCl 0,1 N), antes da autoclavagem à temperatura de  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob condições de fotoperíodo de  $16 \text{ h luz dia}^{-1}$  e densidade de fluxo de fótons  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Foram realizados três subcultivos a cada 45 dias, no período de 135 dias, sendo avaliado os seguintes parâmetros: a) porcentagem de explante responsivo (mensurado pelo número de explante que emitiram brotações), b) número de brotos/explante (mensurado pela contagem individual das brotações em cada explante). Considerou-se na avaliação dos parâmetros, o efeito residual das concentrações e tipos dos osmorreguladores na capacidade responsiva das bromeliáceas em estudo.

O delineamento foi inteiramente casualizado sendo cada tratamento constituído de quatro repetições, onde cada tubo com um explante, foi considerado uma repetição. Para a comparação de médias foi empregado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE INC, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Conservação *in vitro*

Diferenças significativas entre espécies e gêneros de Bromeliaceae (Figuras 1) são evidenciadas nesse estudo, sendo a menor média para crescimento observada no gênero *Hohenbergia*, em relação ao gênero *Aechmea*. Bellintani (2006) em estudos sobre a propagação de Bromeliaceae também observa diferenças entre algumas espécies em relação à resposta morfogênica.



**Figura 1.** Comprimento médio de parte aérea (cm) em Bromeliaceae, independente dos tratamentos, sob conservação *in vitro* aos 360 dias de cultivo. Cruz das Almas – BA, 2010.

O comprimento médio de parte aérea, o número médio de folhas verdes e senescentes bem como o número médio de raízes são influenciados pelas diferentes fontes de carbono e concentrações dos sais MS utilizadas.

Variações dos sais MS agem de forma significativa para a maioria das espécies em estudo promovendo diferenças em relação ao comprimento de parte aérea (Tabela 1). Observa-se, neste trabalho, que geralmente médias mais baixas aconteceram no meio MS completo, com exceção da *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* que obtém o menor desenvolvimento em meio ½ MS. Esses dados divergem de alguns trabalhos onde foram estudadas diferentes concentrações dos sais MS para a conservação *in vitro* e resultados favoráveis foram obtidos utilizando-se o meio MS com metade da concentração dos sais, como em *Amarilis* (AMARAL, 2005); abacaxi (BALZON et al. 2008) e *Aechmea* (MOREIRA, 2008).

A possibilidade da redução dos sais do meio MS, para o melhor desenvolvimento das plantas e a redução de custos em diferentes espécies tem sido sugerida por autores como Oliveira (1994), Pasqual et al. (1998) e Araújo et al. (2004). Paiva et al. (1997) utilizaram 50% dos sais do meio MS, obtendo um bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia. Concentrações dos sais no meio básico MS, reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira preta, cultivar 'Caiguangue' (DANTAS et al., 2000). A redução da concentração de sais minerais no

meio de cultura e da sacarose também permite a manutenção de plântulas em crescimento mínimo (MALAURIE, 2001).

Tratamentos que contem 30 g.L<sup>-1</sup> ou 15 g.L<sup>-1</sup> de manitol promovem, nesse estudo, redução dos valores de comprimento de parte aérea (Tabela 1). Entre essas concentrações, médias significativamente menores ocorrem quando se utiliza 30 g.L<sup>-1</sup> de manitol independente da concentração dos sais MS utilizada, sendo obtidos em meio MS os valores de 2,50; 2,54; 2,44 e 2,55 cm e em meio ½ MS os valores de 2,44; 2,26; 2,45 e 2,48 cm para *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae* respectivamente.

A sacarose promoveu maior desenvolvimento das plantas mesmo quando combinada com o manitol, e as médias mais elevadas ocorreram na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> nas quatro Bromeliaceae em estudo (Figuras 2-6). A combinação 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 15 g.L<sup>-1</sup> manitol diferiu de forma significativa dos tratamentos onde se utilizou somente a sacarose ou o manitol sendo seus valores médios reduzidos em torno de 35% comparados com a sacarose.

O manitol tem sido comumente utilizado na cultura de tecidos, por seu efeito osmótico e morfogenéticos, para simular condições de déficit hídrico porque é um composto quimicamente inerte e não tóxico (AKULA et al., 2000; ÁVILA et al., 2007) e sua importância está relacionada somente a sua ação como agente osmótico na conservação *in vitro*.

Estudos utilizando agentes osmóticos vêm obtendo sucesso no estabelecimento de condições favoráveis a conservação *in vitro* em várias culturas, são exemplos a cana de açúcar (LEMOS et al., 2002), a catuaba (PEREIRA et al., 2003) o maracujá (FARIA et al. 2006), o abacaxi ornamental (SOUZA et al. 2007), entretanto Canto et al. (2004) sugerem o uso do Paclobutrazol no crescimento *in vitro* de plantas de abacaxi visando à conservação do germoplasma.

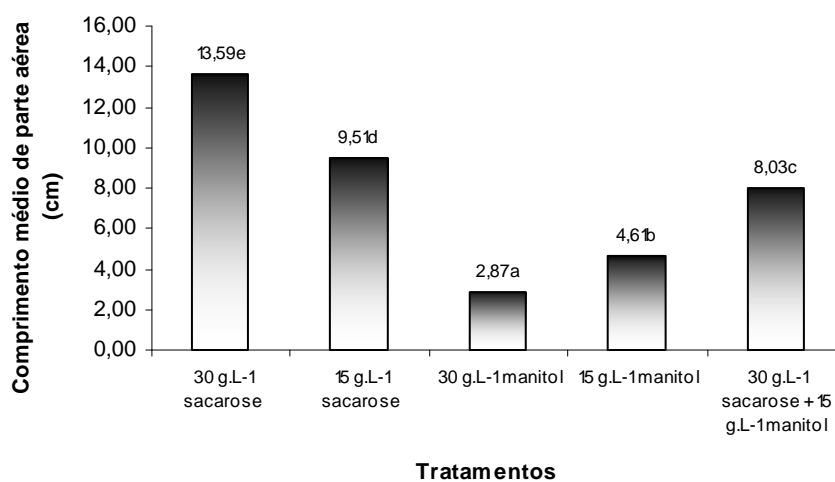
Preferencialmente para a conservação *in vitro* de germoplasma a utilização de agentes osmóticos se faz mais adequada em relação a reguladores vegetais, pois mantém a estabilidade genética do material. Os reguladores vegetais atuam diretamente nas rotas metabólicas da planta, o que não ocorre para os agentes osmóticos, pois sua ação está relacionada com a redução do potencial hídrico no meio de cultura (CALDAS et al. 1998; ENGELMANN, 1998).

**Tabela 1.** Comprimento médio de parte aérea (cm) em Bromeliaceae em duas concentrações dos sais MS e nas diferentes fontes e concentrações de carbono ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro*. Cruz das Almas – BA, 2010.

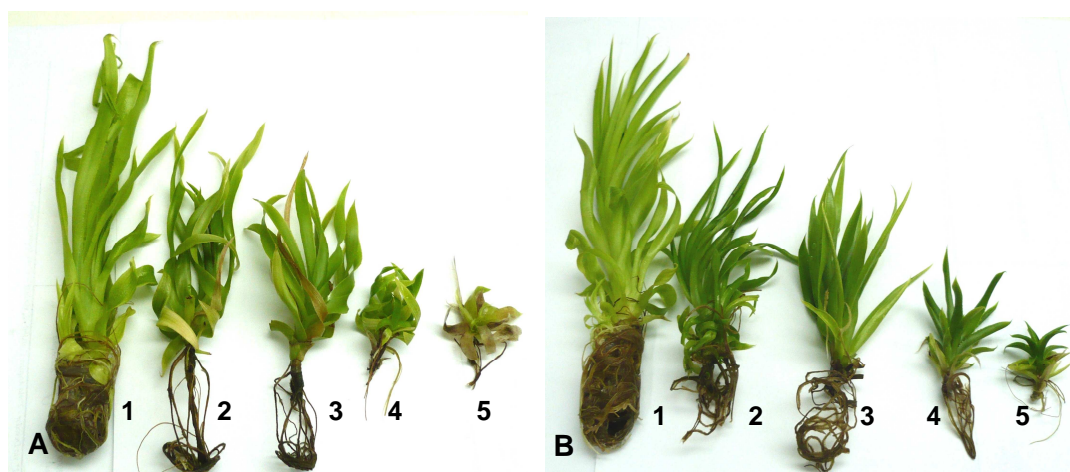
Concentração dos sais MS	30 g.L <sup>-1</sup> sacarose	15 g.L <sup>-1</sup> sacarose	30 g.L <sup>-1</sup> manitol	15 g.L <sup>-1</sup> manitol	30 g.L <sup>-1</sup> sacarose + 15 g.L <sup>-1</sup> manitol	Média
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Ruge) Baker var. <i>bromeliifolia</i>						
MS	9,78eA	7,03dB	2,50aA	3,46bB	6,41cA	<b>5,83A</b>
½ MS	9,90eA	7,34dA	2,44aA	3,78bA	6,08cB	<b>5,90A</b>
<b>Média</b>	<b>9,84e</b>	<b>7,18d</b>	<b>2,47a</b>	<b>3,62b</b>	<b>6,24c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>9,53</b>					
<i>Aechmea distichantha</i> Lem. var. <i>distichantha</i>						
MS	10,96eB	8,32dB	2,54aA	3,63bA	6,30cA	<b>6,35B</b>
½ MS	10,53eA	7,04dA	2,26aA	4,04bB	6,00cA	<b>5,98A</b>
<b>Média</b>	<b>10,75e</b>	<b>7,68d</b>	<b>2,40a</b>	<b>3,84b</b>	<b>6,15c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>11,56</b>					
<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm						
MS	8,61eA	7,55dA	2,44aA	3,53bA	5,30cA	<b>5,48A</b>
½ MS	10,73dB	8,00cA	2,45aA	3,54bA	7,94cB	<b>6,53B</b>
<b>Média</b>	<b>9,67e</b>	<b>7,78d</b>	<b>2,44a</b>	<b>3,53b</b>	<b>6,62c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>12,62</b>					
<i>Hohenbergia catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>						
MS	9,22dA	6,29cA	2,55aA	4,18bB	5,79cA	<b>5,60A</b>
½ MS	10,50eB	6,43dA	2,48aA	3,49bA	5,83cA	<b>5,74A</b>
<b>Média</b>	<b>9,86e</b>	<b>6,36d</b>	<b>2,51a</b>	<b>3,83b</b>	<b>5,81c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>11,17</b>					

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

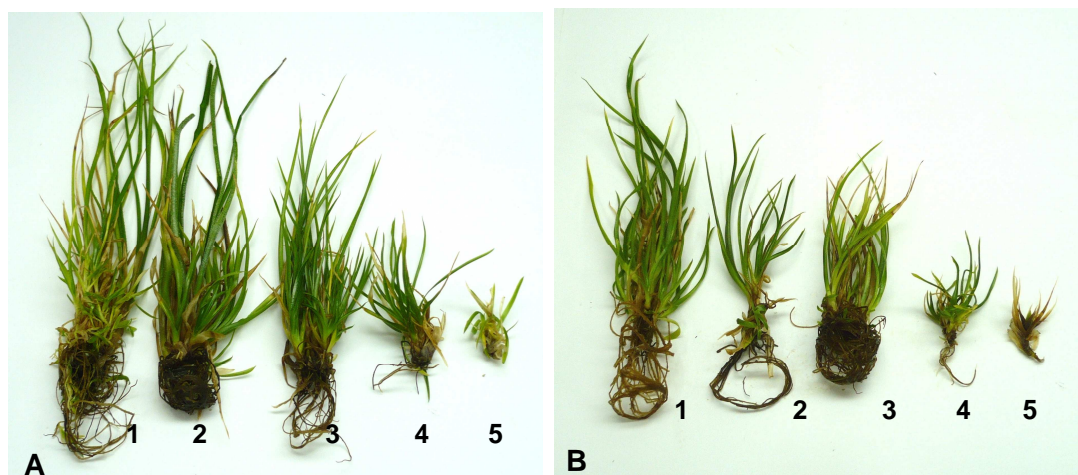




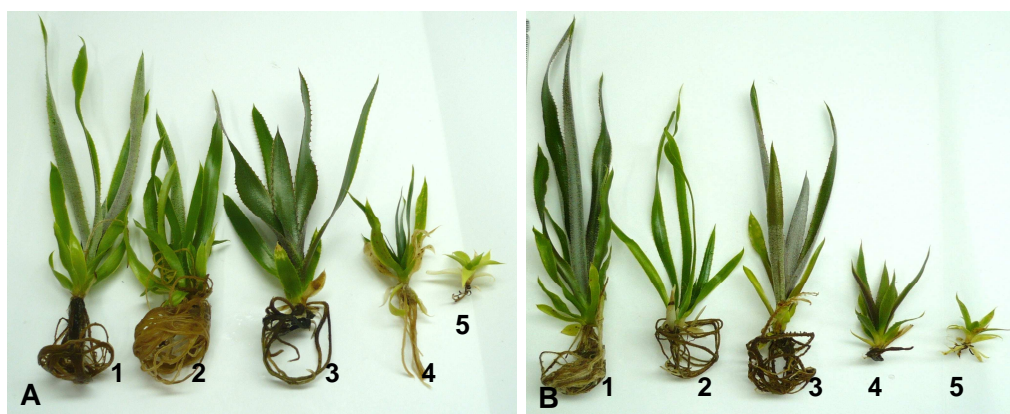
**Figura 2.** Comprimento médio de parte aérea (cm) em Bromeliaceae, independente da espécie e concentrações dos sais MS, sob diferentes fontes e concentrações de carbono aos 360 dias de cultivo *in vitro*. Cruz das Almas – BA, 2010.



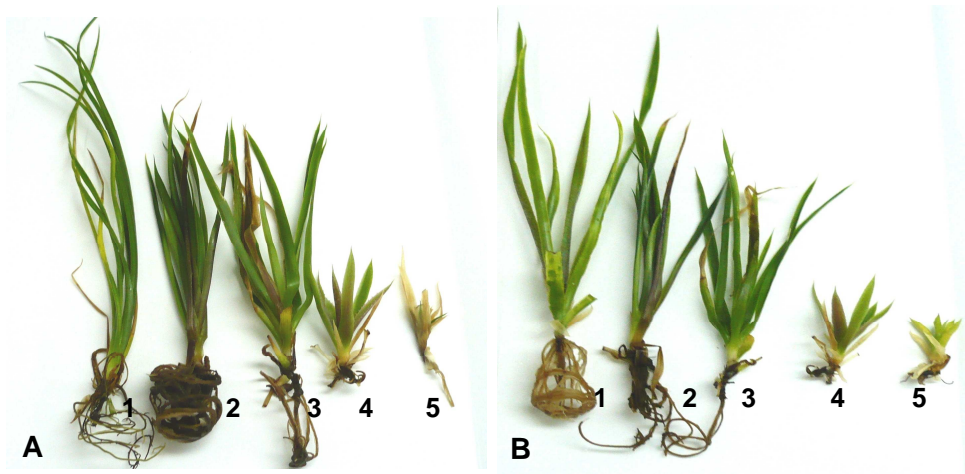
**Figura 3.** *Aechmea bromeliifolia* após 360 dias em meio de crescimento mínimo. MS (A) e  $\frac{1}{2}$  MS (B). 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose (1), 15 g.L<sup>-1</sup> sacarose (2), 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose + 15 g.L<sup>-1</sup> manitol (3), 15 g.L<sup>-1</sup> manitol (4) e 30 g.L<sup>-1</sup> manitol (5). Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 4.** *Aechmea distichantha* após 360 dias em meio de crescimento mínimo. MS (A) e  $\frac{1}{2}$  MS (B).  $30 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose (1),  $15 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose (2),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose +  $15 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (3),  $15 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (4) e  $30 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (5). Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 5.** *Aechmea multiflora* após 360 dias em meio de crescimento mínimo. MS (A) e  $\frac{1}{2}$  MS (B).  $30 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose (1),  $15 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose (2),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose +  $15 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (3),  $15 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (4) e  $30 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (5). Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 6.** *Hohenbergia cattingae* após 360 dias em meio de crescimento mínimo. MS (A) e  $\frac{1}{2}$  MS (B).  $30 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose (1),  $15 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose (2),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose +  $15 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (3),  $15 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (4) e  $30 \text{ g.L}^{-1}$  manitol (5). Cruz das Almas – BA, 2010.

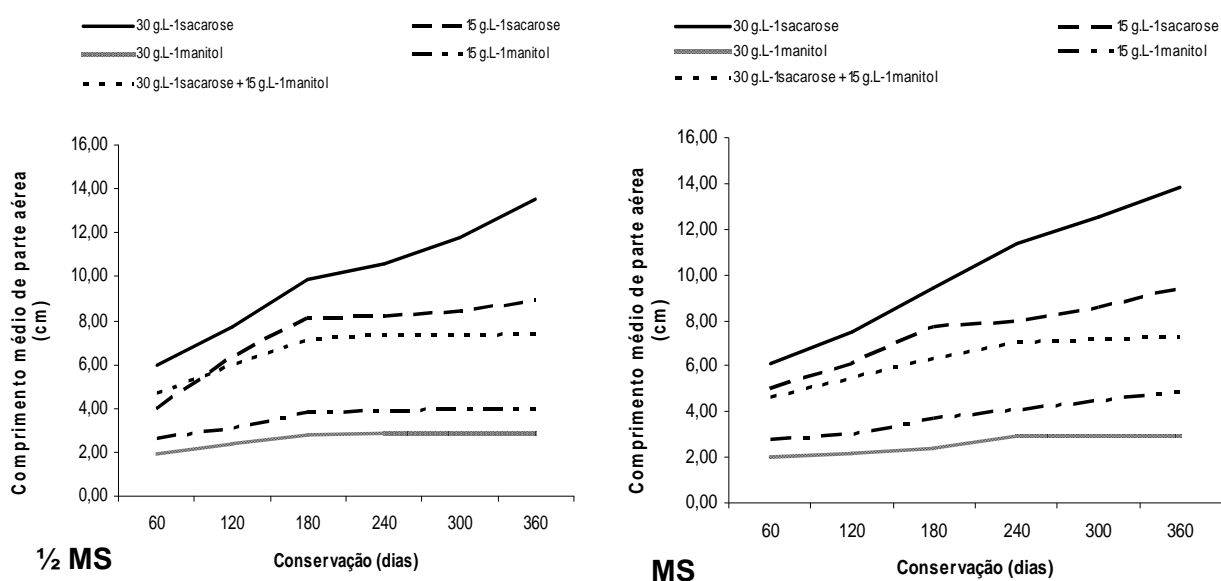
Com relação ao desempenho das espécies ao longo de 360 dias de cultivo observa-se que houve um maior incremento no comprimento da parte aérea nos primeiros meses, para as espécies em estudo (Figuras 7-10). Deste ponto em diante observa-se um padrão tendendo a uniformidade no desenvolvimento nos tratamentos que se utiliza somente o manitol, independente das concentrações dos sais MS.

Os tratamentos que levam a sacarose, mesmo quando em combinação com o manitol, apresentam desempenho semelhantes em relação ao comprimento das plântulas. Em todas as situações o manitol demonstra ser mais eficiente para a conservação sob condição de crescimento mínimo, proporcionando as menores médias. Deve-se ressaltar que o sucesso da técnica depende das características fisiológicas da espécie a ser conservada.

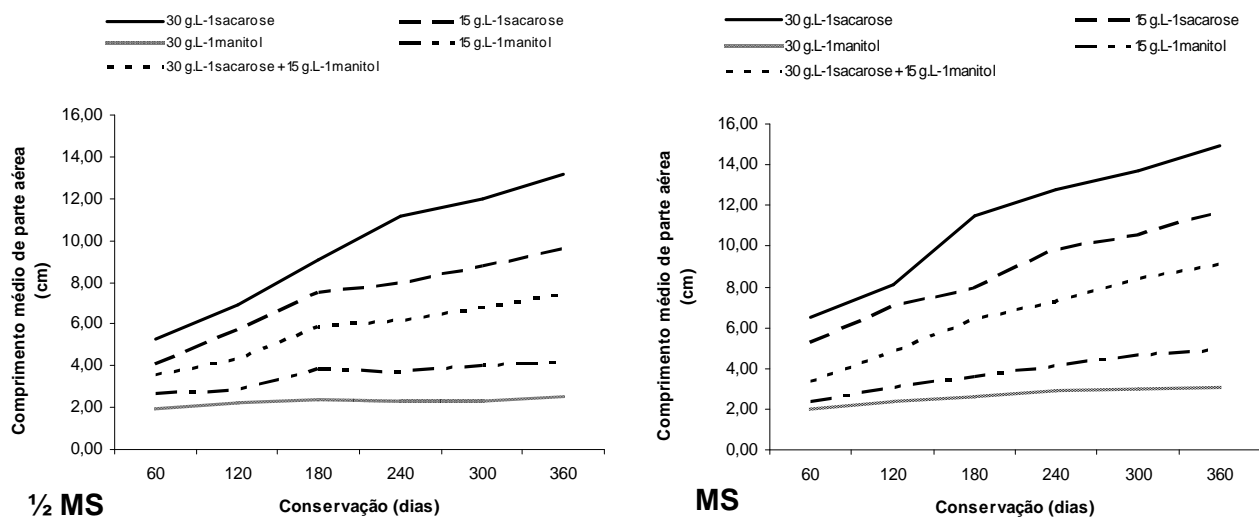
Os açúcares exercem função regulatória em muitos processos vitais das plantas fotossintéticas, entre os quais a regulação da expressão gênica, proliferação e morte celular, crescimento da planta, expansão foliar e senescência e desenvolvimento da semente (GIBSON, 2005; ROLLAND et al., 2006). Segundo Caldas et al. (1998), a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que esse açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. No entanto

para este trabalho é interessante o crescimento mínimo das culturas, porém preservando a qualidade das mesmas.

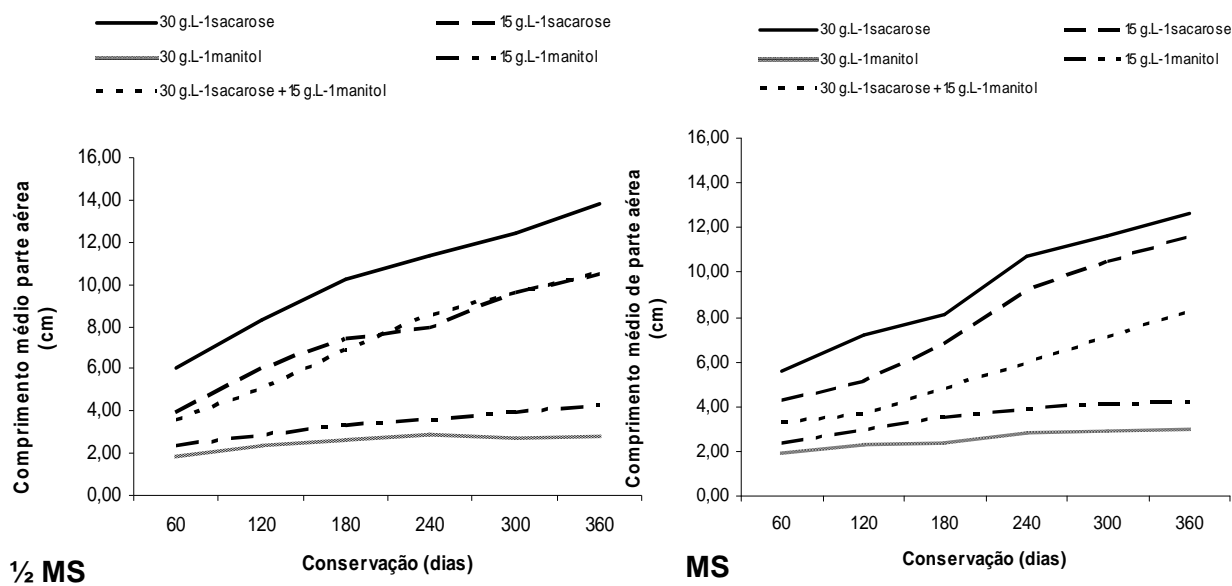
Açúcares alcoólicos, como o sorbitol e manitol, não são usualmente metabolizados pelas plantas, sendo freqüentemente utilizados para modificar o potencial hídrico do meio de cultura, o que não acontece com a sacarose que é mais utilizada e adequada fonte de energia na cultura *in vitro* (THORPE et al., 2008). O estresse osmótico ocorre quando a concentração de moléculas na solução fora da célula é diferente daquela interna à célula. Quando isso acontece, a água flui de dentro ou de fora da célula por osmose, alterando o ambiente intracelular (PONDROM, 2004). Vários estudos têm reportado que o estresse osmótico causa um incremento nos níveis endógenos de ácido absícico (MORGAN, 1984; KAMADA et al., 1993; MADAKADZE; SENARATNA, 2000). O ABA inibe o crescimento por meio do fechamento estomático, limitando, portanto a assimilação de carbono e, conseqüentemente a produção de biomassa (KERBAUY, 2004).



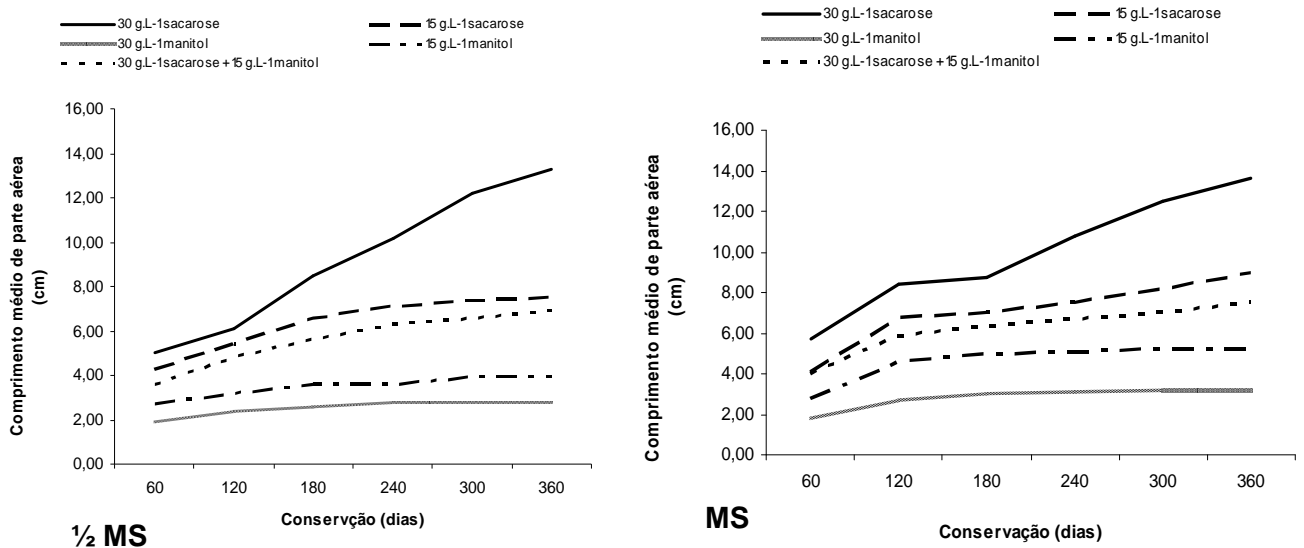
**Figura 7.** Incremento no comprimento da parte aérea em *Aechmea bromeliifolia*. ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro* em diferentes fontes e concentrações de carbono, e concentração dos sais MS. Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 8.** Incremento no comprimento da parte aérea em *Aechmea distichantha*. ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro* em diferentes fontes e concentrações de carbono, e concentração dos sais MS. Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 9.** Incremento no comprimento da parte aérea em *Aechmea multiflora*. ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro* em diferentes fontes e concentrações de carbono, e concentração dos sais MS. Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 10.** Incremento no comprimento da parte aérea em *Hohenbergia catingae*, ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro* em diferentes fontes e concentrações de carbono, e concentração dos sais MS. Cruz das Almas – BA, 2010.

Em relação ao número médio de folhas senescentes observou-se que houve efeito significativo entre os tratamentos independente das espécies avaliadas. Os tratamentos que contém o manitol favorecem o surgimento de folhas senescentes sendo que a concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  desta fonte de carbono possui as maiores médias seguida da concentração de  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Os tratamentos que contém a sacarose ou a combinação sacarose + manitol proporcionam o menor número médio de folhas senescentes (Tabela 2). Observa-se que, para todos os tratamentos, a *Aechmea bromeliifolia* (Ruge) Baker var. *bromeliifolia* revela valores relativamente mais baixo em relação as demais.

Os dados de comprimento sugerem que o manitol sozinho é mais eficiente para a conservação sob condição de crescimento mínimo ao longo de 360 dias de cultivo quando proporciona menores médias, todavia o tratamento com  $30 \text{ g L}^{-1}$  obteve valores médios maiores para número de folhas senescentes, em relação aos demais, o que não é desejável para o estudo proposto, pois ao estender o intervalo entre os subcultivos, as técnicas utilizadas não devem comprometer a qualidade e viabilidade dos explantes.

Canto et al. (2004) enfatiza que a condição de senescência é indesejável *in vitro*, principalmente quando se objetiva a conservação de germoplasma, porque envolve

a realização de um novo subcultivo para que a planta possa recuperar seu vigor e não tenha sua capacidade de regeneração comprometida.

Em relação a concentração dos sais MS, para esta variável, verifica-se que o meio contendo metade dos sais influencia significativamente na formação de folhas senescentes exceto para a *Aechmea bromeliifolia* (Ruge) Baker var. *bromeliifolia* onde não são observadas diferenças significativas entre as duas concentrações em estudo.

**Tabela 2.** Número médio de folhas senescentes em Bromeliaceae em duas concentrações dos sais MS e nas diferentes fontes e concentrações de carbono ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro*. Cruz das Almas – BA, 2010.

Concentração dos sais MS	30 g.L <sup>-1</sup> sacarose	15 g.L <sup>-1</sup> sacarose	30 g.L <sup>-1</sup> manitol	15 g.L <sup>-1</sup> manitol	30 g.L <sup>-1</sup> sacarose + 15 g.L <sup>-1</sup> manitol	Média
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Ruge) Baker var. <i>bromeliifolia</i>						
<b>MS</b>	9,78eA	7,03dB	2,50aA	3,46bB	6,41cA	<b>5,83A</b>
<b>½ MS</b>	9,90eA	7,34dA	2,44aA	3,78bA	6,08cB	<b>5,90A</b>
<b>Média</b>	<b>9,84e</b>	<b>7,18d</b>	<b>2,47a</b>	<b>3,62b</b>	<b>6,24c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>9,53</b>					
<i>Aechmea distichantha</i> Lem. var. <i>distichantha</i>						
<b>MS</b>	10,96eB	8,32dB	2,54aA	3,63bA	6,30cA	<b>6,35B</b>
<b>½ MS</b>	10,53eA	7,04dA	2,26aA	4,04bB	6,00cA	<b>5,98A</b>
<b>Média</b>	<b>10,75e</b>	<b>7,68d</b>	<b>2,40a</b>	<b>3,84b</b>	<b>6,15c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>11,56</b>					
<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm						
<b>MS</b>	8,61eA	7,55dA	2,44aA	3,53bA	5,30cA	<b>5,48A</b>
<b>½ MS</b>	10,73dB	8,00cA	2,45aA	3,54bA	7,94cB	<b>6,53B</b>
<b>Média</b>	<b>9,67e</b>	<b>7,78d</b>	<b>2,44a</b>	<b>3,53b</b>	<b>6,62c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>12,62</b>					
<i>Hohenbergia catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>						
<b>MS</b>	9,22dA	6,29cA	2,55aA	4,18bB	5,79cA	<b>5,60A</b>
<b>½ MS</b>	10,50eB	6,43dA	2,48aA	3,49bA	5,83cA	<b>5,74A</b>
<b>Média</b>	<b>9,86e</b>	<b>6,36d</b>	<b>2,51a</b>	<b>3,83b</b>	<b>5,81c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>11,17</b>					

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

O meio contendo sacarose induziu as maiores médias para a variável folhas verdes (Tabela 3 e Figuras 11-12), ao longo de 360 dias de cultivo, para todas as espécies em estudo, em relação ao meio onde a fonte de carbono foi o manitol, independente da sua concentração, sendo o maior incremento observado até os 180 dias de cultivo onde a partir desse período ocorreu um comportamento tendendo a estabilidade para os tratamentos onde continham a sacarose, mesmo quando combinada com o manitol. Nos tratamentos que possuíam somente o manitol foi verificada uma constância dos valores médios para esta variável.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Moreira (2008) que estudando a conservação *in vitro* em Bromeliaceae obteve resultados semelhantes em relação a diferentes fontes de carbono. Para a combinação 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 15 g.L<sup>-1</sup> de manitol o número de folhas verdes também é superior aos tratamentos onde se utilizada somente o manitol.

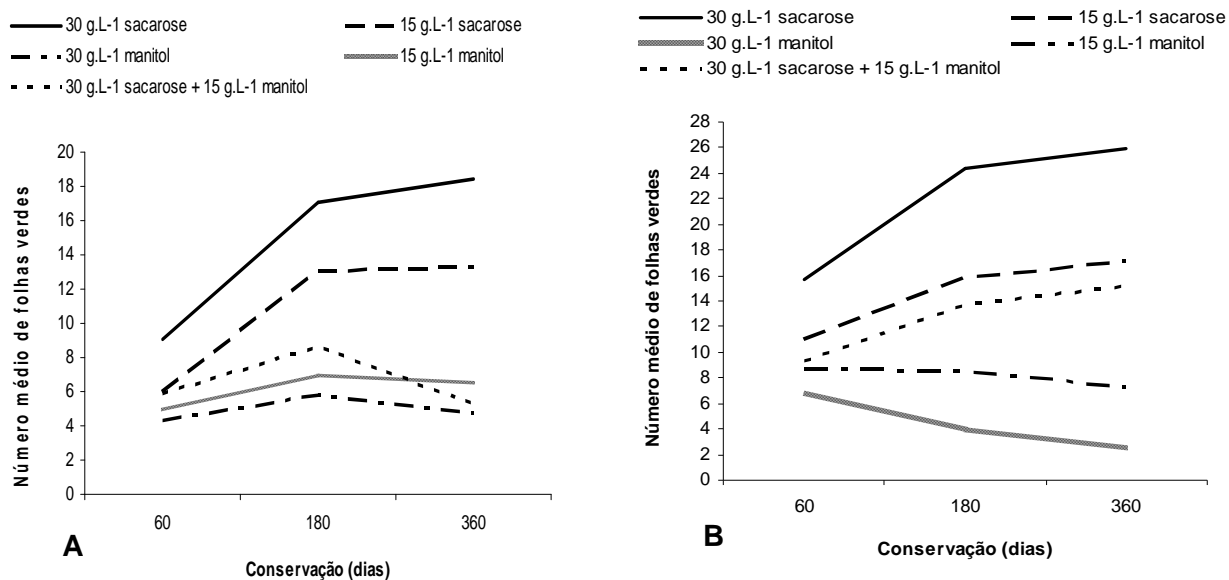
Para a maioria das espécies, exceto para a *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, as maiores médias para folhas verdes foram observadas no meio onde se utiliza o MS com metade da concentração dos sais.



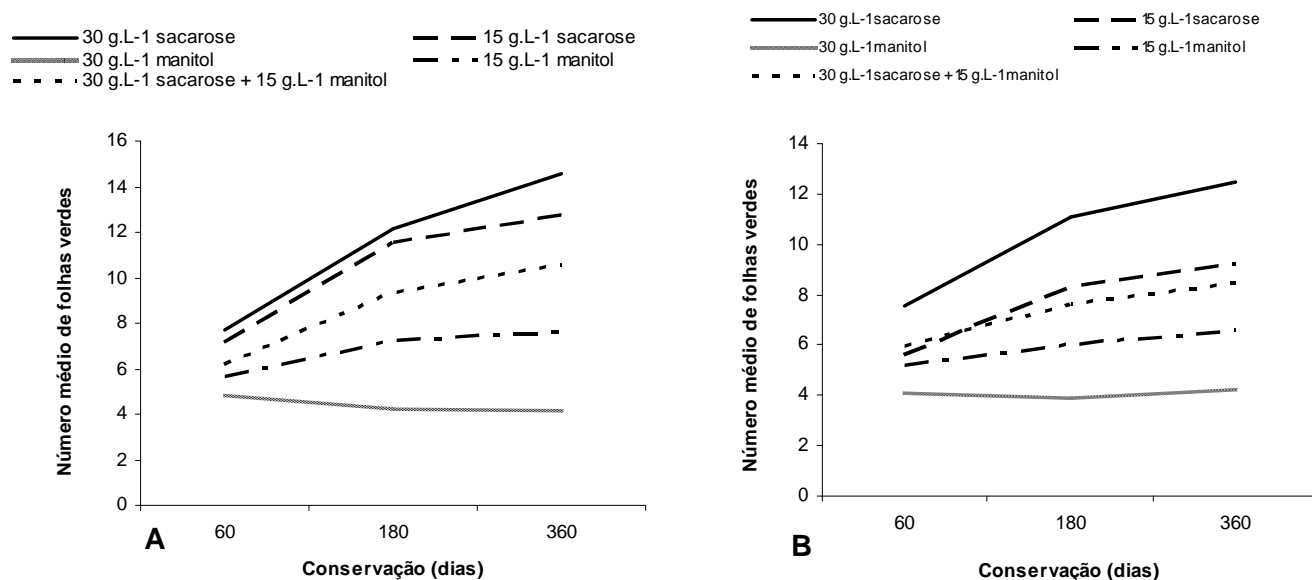
**Tabela 3.** Número médio de folhas verdes em Bromeliaceae em duas concentrações dos sais MS e nas diferentes fontes e concentrações de carbono ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro*. Cruz das Almas – BA, 2010.

Concentração dos sais MS	30 g.L <sup>-1</sup> sacarose	15 g.L <sup>-1</sup> sacarose	30 g.L <sup>-1</sup> manitol	15 g.L <sup>-1</sup> manitol	30 g.L <sup>-1</sup> sacarose + 15 g.L <sup>-1</sup> manitol	Média
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Ruge) Baker var. <i>bromeliifolia</i>						
<b>MS</b>	14,48aB	9,96bB	4,81eB	5,96dA	8,13cA	<b>8,67B</b>
<b>½ MS</b>	15,25aA	11,55bA	5,40eA	6,26dA	7,36cB	<b>9,16A</b>
<b>Média</b>	<b>14,86a</b>	<b>10,75b</b>	<b>5,10e</b>	<b>6,11d</b>	<b>7,75c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>13,20</b>					
<i>Aechmea distichantha</i> Lem. var. <i>distichantha</i>						
<b>MS</b>	21,70aA	16,11bA	4,83eA	8,98dA	13,46cA	<b>13,20A</b>
<b>½ MS</b>	22,26aA	13,23bB	3,91eA	7,33dB	11,98cA	<b>11,74B</b>
<b>Média</b>	<b>21,98a</b>	<b>14,67b</b>	<b>4,37e</b>	<b>8,15d</b>	<b>12,72c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>15,51</b>					
<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm						
<b>MS</b>	10,86aB	9,28bB	5,28dA	6,96cA	8,15abB	<b>8,11B</b>
<b>½ MS</b>	12,08aA	11,65aA	3,56dB	6,75cA	9,28bA	<b>8,66A</b>
<b>Média</b>	<b>11,47a</b>	<b>10,46a</b>	<b>4,42d</b>	<b>6,85c</b>	<b>8,71b</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>18,71</b>					
<i>Hohenbergia catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>						
<b>MS</b>	10,20aA	7,58bA	3,65dB	5,90cA	7,21bA	<b>6,91B</b>
<b>½ MS</b>	10,53aA	7,86bA	4,48dA	5,93cA	7,48bA	<b>7,26A</b>
<b>Média</b>	<b>10,36a</b>	<b>7,72b</b>	<b>4,06d</b>	<b>5,91c</b>	<b>7,35b</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>19,67</b>					

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



**Figura 11.** Incremento no número médio de folhas verdes em Bromeliaceae ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro* em diferentes fontes e concentrações de carbono, independente da concentração dos sais MS. (A) *Aechmea bromeliifolia*; (B) *Aechmea distichantha*. Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 12.** Incremento no número médio de folhas verdes em Bromeliaceae ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro* em diferentes fontes e concentrações de carbono, independente da concentração dos sais MS. (A) *Aechmea multiflora*; (B) *Hohenbergia catinçae*. Cruz das Almas – BA, 2010.

Nesse trabalho 100% dos explantes desenvolveram raízes. Os tratamentos com sacarose acrescida ao meio de cultivo beneficiaram o desenvolvimento de raízes (Tabela 4), independente da sua concentração, ao longo do período de cultivo esses resultados corroboram com 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 que continha a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de manitol promoveu as menores médias para essa variável. Lédo et al. (2007) estudando a conservação *in vitro* em coqueiro anão verificaram o menor desenvolvimento radicular em plântulas mantidas em meio de cultura com manitol aos 365 dias de cultivo.

De acordo com os resultados da tabela 5 pode-se observar que houve efeito significativo entre os tratamentos, tanto para as diferentes fontes de carbono como para as concentrações dos sais MS, sendo o maior incremento observado nas plântulas oriundas do meio ½ MS com 30 g L<sup>-1</sup> sacarose ou 30 mg L<sup>-1</sup> sacarose combinado com 15 g L<sup>-1</sup> de manitol. Estudos comprovaram que 75% a 85% do aumento da biomassa se devem à incorporação de carbono pela adição de sacarose (DE RIEK et al., 1997). O menor valor da produção de massa total da matéria seca esteve associado ao menor número de folhas, raízes, bem como à redução no tamanho médio da parte aérea. Para a relação raiz/parte aérea não houve diferenças estatísticas entre as espécies bem como entre os tratamentos.

O valor da massa seca é uma variável que expressa o desenvolvimento das plântulas *in vitro*, já que, plântulas mais desenvolvidas apresentam valores de massa seca superiores aos das menos desenvolvidas. Diante desse parâmetro, podem-se associar menores valores de massa seca a um maior patamar de conservação da cultura *in vitro*. Desta forma, verifica-se que os tratamentos determinaram o potencial de conservação *in vitro* nas espécies em estudo.

**Tabela 4.** Número médio de raízes em Bromeliaceae em duas concentrações dos sais MS e nas diferentes fontes e concentrações de carbono ao longo de 360 dias de cultivo *in vitro*. Cruz das Almas – BA, 2010.

Concentração dos sais MS	30 g L <sup>-1</sup> sacarose	15 g L <sup>-1</sup> sacarose	30 g L <sup>-1</sup> manitol	15 g L <sup>-1</sup> manitol	30 g L <sup>-1</sup> sacarose + 15 g L <sup>-1</sup> manitol	Média
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Ruge) Baker var. <i>bromeliifolia</i>						
<b>MS</b>	13,13aB	10,66bA	4,25eA	5,55dA	6,81cB	<b>8,08B</b>
<b>½ MS</b>	14,13aA	10,73bA	4,20eA	5,36dA	7,50cA	<b>8,38A</b>
<b>Média</b>	<b>13,63a</b>	<b>10,70b</b>	<b>4,22e</b>	<b>5,45d</b>	<b>7,15c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>13,19</b>					
<i>Aechmea distichantha</i> Lem. var. <i>distichantha</i>						
<b>MS</b>	12,38aA	9,11bA	4,21dA	6,11cA	6,83cB	<b>7,73A</b>
<b>½ MS</b>	10,20aB	9,51bA	4,26dA	4,33dB	8,98cA	<b>7,46A</b>
<b>Média</b>	<b>11,29a</b>	<b>9,31b</b>	<b>4,24e</b>	<b>5,22d</b>	<b>7,90c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>15,45</b>					
<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm						
<b>MS</b>	12,46aA	10,10bA	3,15dA	5,51cA	6,15cB	<b>7,47A</b>
<b>½ MS</b>	11,96aA	9,16bA	3,75cA	4,13cB	10,03bA	<b>7,81A</b>
<b>Média</b>	<b>12,21a</b>	<b>9,63b</b>	<b>3,45e</b>	<b>4,82d</b>	<b>8,09c</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>19,31</b>					
<i>Hohenbergia catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>						
<b>MS</b>	7,51aA	5,45bA	2,85dB	4,11cA	5,43bA	<b>5,07A</b>
<b>½ MS</b>	7,80aA	5,46bA	3,53cA	3,93cB	5,30bA	<b>5,20A</b>
<b>Média</b>	<b>7,65a</b>	<b>5,45b</b>	<b>3,19d</b>	<b>4,02c</b>	<b>5,36b</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>20,58</b>					

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

**Tabela 5.** Massa total da matéria seca (g) de Bromeliaceae em função das diferentes fontes de carbono e concentração dos macronutrientes do meio MS. Cruz das Almas - BA, 2010.

Tratamentos					
Concentração do sais MS	30 g L <sup>-1</sup> sacarose	15 g L <sup>-1</sup> sacarose	30 g L <sup>-1</sup> manitol	15 g L <sup>-1</sup> manitol	30 g L <sup>-1</sup> sacarose + 15 g L <sup>-1</sup> manitol
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker var. <i>bromeliifolia</i>					
<b>MS</b>	0,234aA	0,099abA	0,058bA	0,065bA	0,185abA
<b>½ MS</b>	0,254aA	0,175aA	0,025bA	0,037bA	0,265aA
<i>Aechmea distichantha</i> Lem. var. <i>distichantha</i>					
<b>MS</b>	0,477aA	0,145cA	0,034cA	0,048cA	0,299bB
<b>½ MS</b>	0,294bB	0,203bA	0,032cA	0,055cA	0,463aA
<i>Aechmea multiflora</i> L.B. Sm					
<b>MS</b>	0,252abA	0,153bcA	0,183bcA	0,049cA	0,325aA
<b>½ MS</b>	0,312aA	0,142bA	0,030bB	0,058bA	0,319aA
<i>Hohenbergia catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>					
<b>MS</b>	0,202aA	0,087abA	0,025bA	0,041bA	0,136abA
<b>½ MS</b>	0,172aA	0,080abA	0,030bA	0,027bA	0,169aA

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

### Regeneração *in vitro* utilizando o benzilaminopúria (BAP).

Nesse trabalho 100% dos explantes apresentaram respostas morfogênicas em relação à formação de brotos.

Os dados relativos ao número médio de brotações por explante demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos apenas para explantes de *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* oriundos do meio de conservação acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose que obteve os melhores resultados (14,12 brotos/explante) (Tabela 6). Apesar das demais espécies não apresentarem diferenças significativas em relação ao meio de conservação aos quais os explantes foram originados, verifica-se uma tendência das melhores médias de regeneração nos explantes oriundos do meio que utilizou 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Considerando as diferentes espécies é verificado que a *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha* também se destaca quando demonstra as melhores médias para todos os tratamentos testados, nesse experimento. Em relação as diferentes concentrações dos macronutrientes do MS, quais foram conservados os explantes, não são observadas diferenças estatísticas.

Moreira (2008) estudando efeito residual dos meios de conservação na capacidade de multiplicação dos explantes de *Aechmea miniata* e *Aechmea fasciata* observou diferenças significativas entre tratamentos e entre espécies, sendo as melhores médias expressas para os explantes originários do meio de conservação suplementado com 87,67 mM (30 g L<sup>-1</sup>) de sacarose, com em média 3,12 brotos/explante para *A. fasciata* e 2,10 brotos/explante para *A. miniata* respectivamente.

A resposta morfogênica da regeneração de novas brotações do material vegetal conservado *in vitro* é referência do sucesso em um protocolo de conservação. Nesse experimento fica evidente que o meio de conservação utilizado não compromete a capacidade responsiva dos explantes, mesmo estes oriundos de tratamentos com diferentes concentrações dos sais MS ou diferentes tipos e concentrações de carbonos.

**Tabela 6.** Número médio de brotações em explantes de Bromeliaceae oriundos da conservação *in vitro*, independente da concentração dos sais MS, após 360 dias de cultivo. Cruz das Almas - BA, 2010.

Genótipos	Tratamentos				
	30 g.L <sup>-1</sup> sacarose	15 g.L <sup>-1</sup> sacarose	30 g.L <sup>-1</sup> manitol	15 g.L <sup>-1</sup> manitol	30 g.L <sup>-1</sup> sacarose + 15 g.L <sup>-1</sup> manitol
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Ruge) Baker var. <i>bromeliifolia</i>	8,37aB	7,37aB	5,25aAB	5,12aB	7,12aAB
<i>Aechmea distichantha</i> Lem. var. <i>distichantha</i>	14,12aA	13,37abA	6,00dA	8,50cdA	10,00bcA
<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm	4,62aC	3,12aC	2,50aB	3,12aB	4,50aB
<i>Hohenbergia catingae</i> Ule var. <i>catingae</i>	4,75aC	3,62aC	3,25aAB	3,50aB	5,87aB

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.

## CONCLUSÕES

Os obtidos nesse estudo demonstram ser viável a técnica de manutenção sob condição de crescimento mínimo *in vitro* das espécies *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, por 360 dias em meio MS com metade da concentração dos sais contendo 15 g.L<sup>-1</sup> de manitol sem comprometer a fase de recuperação do material conservado, fato este que é de suma importância em um protocolo para manutenção de germoplasma sob crescimento mínimo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKULA A.; AKULA, C.; BATESON M. Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) **Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 241 – 246, 2000.
- AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis**. 2005. 94f. (Dissertação Mestrado), Instituto Agrônomo (IAC). Campinas, 2005.
- ANDRADE-LIMA, D. (1981), The caatingas dominium. **Revista Brasileira de Botânica**, 4(2), 149-153.
- ARAÚJO, A.G. *et al.* Multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 117-127, 2004.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L. E.; SCAPIM, C. A.; FAGLIARI, J. R.; SANTOS, J. L. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 29, n. 1, p.98-106, 2007.
- BALZON, T. A.; CARDOSO, L. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi (*Ananas* sp.) sob regime de crescimento mínimo. **XX Congresso Brasileiro de Fruticultura** 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture 12 a 17 de Outubro de 2008 - Vitória/ES.
- BELLINTANI, M. C. **Estudo da propagação *in vitro* de *Neoregelia mucugensis* Leme, *Orthophytum albopictum* Philcose, espécies de Bromeliaceae**

- endêmicas da Bahia.** (Tese doutorado). Departamento de ciências biológicas. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2006.
- CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C. ; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S. ; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol.. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** Nota científica Brasília, v. 39, n. 7, p. 717-720, jul. 2004.
- CONCEIÇÃO, A. M. da; FORTES, G. R. de L.; SILVA, J. B. da. Conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum*) cvs. Baronesa e Santo Amor: efeito sobre a formação de gemas e brotações dos segmentos caulinares. *Agropecuária de Clima Temperado*, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 67-71, 1998.
- DANTAS, M. C. A. et al. Enraizamento *in vitro* da amoreira preta (*Rubus sp.*) cultivar Caigangue. **Agropecuária de Clima Temperado**, v. 03, n. 02, p. 123-130, 2000.
- DE RIEK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for Micropropagation of *Rosa multiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 47, n. 03, p. 269-278, 1997.
- DORION, N.; KADRI, M.; BIGOT, C. *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 298, p. 335-343, 1991.
- 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, n. 14, p. 243-250, 1993.
- ENGELMANN, F. *In vitro* germplasm conservation. In: DREW, R.A. [ed.]. **Tropical & Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/Embrapa – CNPH, 1998.
- 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. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.
- GIBSON, S.I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current opinion in plant biology**, v. 8, p. 93 – 102, 2005.
- GOLMIRZAI, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweet potato germplasm. In: ARTHUR, C.; FERGUNSON, P.; SMITH, B. (Ed.). Impact on a changing world: program report 1997-1998. Lima: International Potato Center, 1999. p. 351-356.



- KAMADA, H.; HARADA, H. Changes in endogenous amino acids compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. **Plant Cell Physiology**, v. 25, p. 27– 38, 1984.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452 p. 2004.
- LÉDO, A. S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M. e TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento em coqueiro anão. **Magistra**, v. 19, n. 4, p. 346-351. Cruz das Almas-BA, 2007.
- LEMO, 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**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.
- MADAKADZE, R.M.; SENARATNA, T. Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium x hortorum*) somatic embryos. **Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 55 – 60, 2000.
- MARTINELLI, G. **Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic rainforest of southeastern Brazil**. PhD thesis, University of St Andrews, Scotland, UK. 1994.
- 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**, 59 (1): 209-258. 2008.
- MARTIN, C.; IRIONDO, J. M.; GONZALES-BENITO, E.; PEREZ, C. The use of tissue culture techniques in the conservation of plant biodiversity. *Agro Food Industry Hi-Tech*, Milan, v. 9, n. 1, p. 37-40, 1998.
- MORGAN, J.M. Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 299 – 319, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473 479, 1962.
- MENDES, R.; GOES, M.D. **Cultura de Tecido na Conservação de Germoplasma Vegetal**. DIALOGO XLV. Conservação de Germoplasma Vegetal. Montevideu: IICA / PROCISUR. 163 p.1996.
- MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 68f. (Dissertação Mestrado) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2008.
- PASQUAL, M. *et al.* **Cultura de tecido s-** Introdução: Fundamentos básicos. Lavras: Ufla/Faepe, 1998. PAIVA, P.D.O. *et al.* Propagação *in vitro* de Gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.

- PEREIRA, A.M.S. et al. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: conservation of an endangered medicinal plant. **Planta Medica**, v.69, p.571-3, 2003.
- OLIVEIRA, P.D. **Propagação in vitro de crisântemo (*Dendrathera grandiflora* Tzelev.) cv. Orange Reagen**. 1994. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras, 1994.
- 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.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 675 – 709, 2006.
- SOUZA, E.R.; COSTA, M. A. P. C; ROCHA, M. A. C. **Multiplicação e conservação in vitro de *Ananas lucidus*...** Disponível em: <[http://www.ufrb.edu.br/sprb/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=2](http://www.ufrb.edu.br/sprb/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=2) -> Acesso em: 08 de outubro 2010.
- THORPE, T; STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (eds). **Plant Propagation by Tissue Culture**, v.1, 3<sup>rd</sup> edn – The Background, Springer, Netherlands, pp. 115 -173. 2008.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI: Embrapa, CNPH, 1998. v.1 p. 297-329. 1998.
- XAVIER, L. P. (1982). **O caroá**. 2 ed. Natal: EMPARN. 270 p. (EMPARN. Documentos. 7. ESAM. Coleção Mossoroense, 247). 1982.

## **CAPÍTULO 3**

### **GERMINAÇÃO E VIGOR DE PLÂNTULAS DE DUAS ESPÉCIES DE BROEMELIACEAE EM DIFERENTES SUBSTRATOS.<sup>3</sup>**

---

<sup>3</sup> Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Acta Botânica Brasileira

## GERMINAÇÃO E VIGOR DE PLÂNTULAS DE DUAS ESPÉCIES DE BROEMELIACEAE EM DIFERENTES SUBSTRATOS.

**Resumo:** O estudo teve como objetivos avaliar o desenvolvimento de duas espécies de Bromeliaceae em diferentes substratos, fornecendo informações sobre o tipo de germinação e de plântula bem como tempo médio de germinação, além de descrever a morfologia do desenvolvimento pós-seminal. As sementes foram submetidas a cinco tratamentos: Papel no escuro; Papel, areia, Vermiculita<sup>®</sup> e Plantmax<sup>®</sup> na luz. Foi feita a semeadura sobre os substratos, em caixas plásticas Gerbox<sup>®</sup>, as quais foram mantidas em câmaras BOD a 30 °C. As avaliações da germinação foram diárias. Foi considerada como semente germinada quando ocorreu o rompimento dos tegumentos e protrusão da raiz primária. Utilizou-se quatro repetições de 50 sementes para avaliação da porcentagem de germinação e do índice de velocidade de germinação (IVG). A germinação iniciou-se a partir do 4º dia após a semeadura para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. tendo sua estabilização aos 11 dias de monitoramento e a partir do 5º dia para a *Neoregelia sanguinea* com estabilização aos 21 dias. A germinação foi caracterizada como do tipo epígea e plântulas criptocotiledonares para ambas as espécies. O substrato Vermiculita<sup>®</sup> se destacou para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. Para a *Neoregelia sanguinea* os substratos avaliados não diferiram entre si, mas houve uma tendência de maior porcentagem germinação e vigor de sementes e plântulas em Plantmax<sup>®</sup>, Vermiculita<sup>®</sup> e papel.

**Palavras - chave:** Bromélia; Germinação; morfologia.

## GERMINATION AND SEEDLING VIGOR OF TWO SPECIES IN DIFFERENT SUBSTRATES BROEMELIACEAE.

**Abstract:** The study aimed to evaluate the development of two species of Bromeliaceae on different substrates, providing information on the type of germination and seedling and mean germination time, and describe the morphology of the post-seminal development. Seeds were subjected to five treatments: Role in the dark; paper, sand, vermiculite and Plantmax<sup>®</sup> in the light. It was sowed on the substrates, plastic boxes Gerbox<sup>®</sup>, which were kept in BOD chambers at 30°C. Assessments of germination were daily. Was considered germinated seed when there was disruption of the tegument and radicle protrusion. We used four replications of 50 seeds for evaluation of germination and germination speed index (IVG). The germination started from the 4th day after sowing for *Hohenbergia stellata* Schultes f. and its stabilization at 11 days of monitoring, and from day 5 to *Neoregelia sanguinea* with stabilization at 21 days. Germination was characterized as the epigeal and cryptocotylar seedlings for both species. The substrate Vermiculite<sup>®</sup> stood out for *Hohenbergia stellata* Schultes f. *Neoregelia sanguinea* for the substrates used did not differ, but there was a tendency of higher percentage germination and seed vigor and seedling Plantmax<sup>®</sup>, Vermiculite<sup>®</sup> and paper.

**Key - words:** Bromeliad; Germination; morphology.

## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae são plantas monocotiledôneas e está dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tiliandisiodeae e Bromelioideae, sendo todas nativas das zonas tropicais e subtropicais do continente americano com exceção de uma única espécie, *Pitcairnia feliciana*, que ocorre na África (SMITH; DOWNS 1974; PAULA; SILVA 2004). Segundo Luther (2006) compreende 57 gêneros e mais de 3.000 espécies classificadas de acordo com as características florais e morfológicas dos frutos e sementes.

Devido ao seu valor ornamental, por sua exuberância, rusticidade e diversidade de cores e formas, várias espécies de Bromeliaceae sofrem ação extrativista e predatória em seus habitats naturais e encontram-se ameaçadas de extinção.

A ação humana tem levado muitos ambientes naturais a alterações que os alteram irreversivelmente. Esta situação torna-se ainda mais grave devido ao desconhecimento das estratégias de regeneração espontânea, do crescimento de algumas espécies, do abortamento de sementes e da mortalidade de plântulas, das taxas de crescimento das espécies nativas e de sua fenologia (TORRES, 1985). Este fato implica na necessidade de se tomarem medidas que conduzam à conservação dos recursos genéticos.

As espécies nativas, de um modo geral, apresentam crescimento lento, daí a importância de se definir um substrato que promova boa a velocidade e uniformidade na germinação aliado a temperatura e a boas condições fisiológicas da semente. Plantas epífitas como as bromélias exigem substratos de baixa densidade, alta permeabilidade e aeração. A presença de matéria orgânica em grande proporção no meio de cultivo pode melhorar tais características (KAMPF, 1992).

O teste de germinação é o parâmetro oficial mais utilizado para a avaliação da qualidade fisiológica de uma semente, sendo de elevada importância em programas de controle de qualidade (CAMPOS, 1997) e segundo Aguiar et al. (1993) o conhecimento da germinação tem sido ressaltado, por diversos autores, como imprescindível para se compreender o ciclo biológico e os processos de estabelecimento da vegetação nativa, assim como para produção de mudas em viveiros. Para um grande número de espécies cultivadas existem recomendações para condução do teste de germinação (BRASIL, 1992). No entanto, espécies como as a família Bromeliaceae necessitam de informações. Segundo Mercier e Guerreiro

Filho (1990) a germinação de sementes é um aspecto pouco estudado na reprodução de bromélias.

A determinação do tipo de substrato a ser utilizado é um fator relevante, devido a problemas relacionados aos efeitos sobre a translocação de água, ao sistema solo-planta-atmosfera e no estabelecimento do sistema radicular (SPURR & BARNES, 1973).

A reunião de informações sobre a velocidade de germinação de sementes, aliada aos dados sobre a morfologia e desenvolvimento de plântulas, é muito útil nos trabalhos em viveiros, em pesquisas sobre armazenamento de sementes e na regeneração de diversas espécies (KUNIYOSHI, 1983). A necessidade de trabalhos visando ao esclarecimento da estrutura das plântulas vem sendo ressaltada desde o início do século (COMPTON, 1912), porém, os dados disponíveis ainda são escassos, conforme salienta Garwood (1995).

O conhecimento da morfologia da semente e do desenvolvimento pós-seminal permite entender a fitogenia e as tendências evolutivas dessas estruturas, constituindo assim uma ferramenta útil para iniciar a identificação de sementes desconhecidas, contribuindo para a caracterização de grupos taxonômicos (ROSA et al. 2005) bem como para estudos sobre regeneração em ecossistemas naturais (OLIVEIRA 2001; MELO; VARELA 2006), visto que a emergência e o estabelecimento das plântulas são considerados estágios decisivos no ciclo de vida das plantas (FENNER, 1985; MELO et al. 2004). Neste sentido consideram-se como prioritários estudos que contemplem espécies como as da família Bromeliaceae dado o interesse científico que elas proporcionam face ao valioso germoplasma que possuem.

Diante do exposto o estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de duas espécies de Bromeliaceae, testando diferentes substratos, fornecendo informações sobre o tipo de germinação e de plântula bem como tempo médio de germinação, além de descrever a morfologia do desenvolvimento pós-seminal.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), município de Cruz das Almas, Bahia. Sementes de *Hohenbergia stellata* Schultes f. e *Neoregelia sanguínea* foram

coletadas de frutos maduros e em início de deiscência, na reserva florestal da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, estas foram extraídas manualmente, sendo a mucilagem que envolve as sementes de Bromelioideae retirada para evitar a proliferação de fungos. As sementes foram armazenadas e acondicionadas em recipientes plásticos semipermeáveis dotados de tampa, mantendo-se em condições ambientais até a conclusão do trabalho.

Para a descrição biométrica das sementes, comprimento, largura e espessura, foram escolhidas ao acaso 20 sementes de aproximadamente 10 indivíduos diferentes, escolhidos aleatoriamente, medidas individualmente com paquímetro digita. O peso de mil sementes foi determinado utilizando balança analítica de precisão, utilizando-se quatro repetições de 500 sementes, conforme metodologia adaptada de Brasil (1992). Determinou-se o teor de água das sementes na base úmida, pelo método da estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (BRASIL, 1992), utilizando quatro repetições de 100 sementes.

A semeadura foi realizada em caixas plásticas tipo Gerbox, contendo duas folhas de papel filtro, pré-umedecidas com um volume de água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel (Brasil, 1992), areia lavada e esterelizada, Plantmax<sup>®</sup> e Vermiculita<sup>®</sup>. Os três últimos substratos foram umedecidos com 50,0 mL; 35,0 mL e 42,0 mL de água destilada, respectivamente, conforme foi percebido indício de umidade no fundo do recipiente. O delineamento experimental para o teste de germinação foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e 100 sementes por repetição.

Cada tratamento foi constituído por quatro repetições de 50 sementes. A avaliação da germinação foi diária até a estabilização, tendo os seus dados expressos em porcentagem de sementes germinadas para cada tratamento. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi obtido segundo Maguire (1962) pela fórmula:

$$*IVG = \sum \left( \frac{g^i}{d^i} \right)$$

Onde  $g_i$ : número de sementes germinadas na  $i$ ésima contagem e

$d_i$ : número de dias para germinar a partir da semeadura até a  $i$ ésima contagem.

Foi considerada como semente germinada quando ocorreu o rompimento dos tegumentos e protrusão da raiz primária. As médias para porcentagem de



germinação e porcentagem de emergência foram transformadas para arc sen  $[(x+0,5)/100]^{0,5}$  para aproximação à curva normal (STEEL; TORRIE 1980).

Também foi avaliado o comprimento (mm) médio da parte aérea (determinado com paquímetro digital a partir do colo até a extremidade da maior folha); comprimento (mm) médio de raízes (determinado com paquímetro digital a partir do colo até a extremidade da raiz principal) e massa fresca da plântula (g) (determinada com balança analítica de precisão). Para o comprimento médio da parte aérea, para o comprimento médio da raiz e a massa fresca da plântula utilizou-se para a avaliação 25 plântulas de cada repetição.

Encerrada as avaliações da germinação definiu-se o momento da primeira e da última contagem, expressos em porcentagem. Para determinar a primeira contagem considerou o número de dias, em que em média de 50% das sementes germinaram em pelo menos um dos tratamentos.

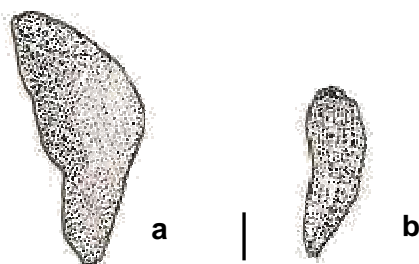
Foram realizadas as análises das propriedades físicas dos substratos como densidade aparente, porosidade total e capacidade de retenção de água, pela metodologia de Fretz (1979), sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Realizou-se a correlação simples de Pearson entre as variáveis dos atributos dos substratos e as variáveis avaliadas na germinação (PIMENTEL-GOMES, 2000), comparando as médias pelo teste T distribuição bilateral (SANTANA; RANAL, 2004).

A ilustração e descrição da morfologia e estrutura organizacional das sementes seguiram-se a terminologia adotada por Smith e Downs (1974) e Beltrati (1994); sendo realizada á mão livre, com posterior confecção de pranchas com tinta nanquim sobre papel vegetal. A descrição das fases do desenvolvimento pós-seminal da plântula foi considerada até a terceira folha totalmente expandida para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. e a segunda folha totalmente expandida para a *Neoregelia sanguínea*. Quanto à descrição das plântulas adotou-se a terminologia de Pereira (1988).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

O fruto de *Hohenbergia stellata* Schultes f. é composto em média por 57 sementes, sendo estas pequenas (Figura 1a), elípticas, medindo aproximadamente 3,1mm de comprimento e largura de 0,8 mm, sem apêndice, envolvidas em uma substância mucilagínosa, com teor de água de 67% b.u. A massa média da matéria

fresca e seca de 1000 sementes foi de 1,85g e 0,52g, respectivamente. Quanto a *Neoregelia sanguínea* cada fruto é constituído em média por 79 sementes, também pequenas (Figura 1b), elípticas, sendo que cada semente apresenta comprimento médio de 2,0 mm e largura de 0,4 mm, sem apêndice, envolvidas por uma substância mucilaginosa, com teor de água de 29,1% b.u. A massa média da matéria fresca e seca de 1000 sementes foi de 0,35g e 0,25g, respectivamente (Tabela 1).



**Figura 1.** Aspecto da semente de *Hohenbergia stellata* Schultes f. (a) e *Neoregelia sanguínea* (b). Cruz das Almas - BA, 2010. Barra: 5mm.

Com relação à morfologia das sementes, em ambas as espécies estudadas, os resultados obtidos estão de acordo com as características morfológicas das sementes encontradas em diversas espécies Bromeliaceae. Pereira et al., (2008) estudando a morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal em seis espécies de Bromeliaceae, observaram que as espécies que pertenciam a subfamília Bromelioideae (*Aechmea blanchetiana*, *Wittrockia gigantea*) apresentavam sementes pequenas, elípticas, sem qualquer tipo de apêndice e envolvidas por substância mucilaginosa.

ANASTÁCIO e SANTANA (2010) encontraram o teor de água de 35% em sementes de *Ananas ananassoides*. Carvalho e Nakagawa (2000) afirmam que, uma vez que a semente atinge a máxima acumulação de matéria seca ela passa a não receber mais fotossintetizados da planta e, nesse ponto o teor de água geralmente é elevado, oscilando entre 30% e 50%. Espécies como *Pterogyne nitens* atingem a maturidade fisiológica com teores de água mais elevados, entre 60% e 65%

(CARVALHO et al.,1980) e outras, como *Caesalpinia echinata*, teores médios entre 30% e 40% (BORGES et al., 2005).

Os teores de água observados nas espécies em estudo estão adequados para a germinação, contudo são considerados altos para o processo de conservação das sementes. O conhecimento do teor de umidade possibilita a preservação da qualidade física e fisiológica da semente, permitindo a escolha mais adequada para os procedimentos de colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento (NERY; CARVALHO; OLIVEIRA, 2004). Existem informações ainda insuficientes sobre a determinação mais adequada do teor de umidade para espécies ornamentais nativas, o que provoca dificuldade na uniformização dos procedimentos básicos dos resultados de umidade (RAMOS; BIANCHETTI, 1990).

**Tabela 1.** Dimensões da semente (DS); teor de água da semente (TA); massa da matéria fresca de 1000 sementes (MF); massa da matéria seca de 1000 sementes (MS) e número médio de sementes por fruto (NSF) em duas espécies de Bromeliaceae. Cruz das Almas – BA, 2010.

<b>Espécie</b>	<b>DS (mm)</b>	<b>TA (% b. u.)</b>	<b>MF (g)</b>	<b>MS (g)</b>	<b>NSF</b>
<i>Hohenbergia stellata</i> Schultes f.	3,1 x 0,8	71,90	1,85	0,52	57
<i>Neoregelia sanguinea</i>	2,0 x 0,4	29,1	0,55	0,25	79

Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram diferenças significativas para todos os atributos dos substratos avaliados. A maior densidade (DENS) foi observada na areia, assim como as menores médias para a porosidade total (PT) e para a capacidade de retenção de água (CRA). A menor densidade e as maiores médias de porosidade total e capacidade de retenção de água foram observados para a vermiculita.

Verdonck et al. (1981) afirmam que as características físicas do substrato são as mais importantes, por causa das relações ar-água não poderem sofrer mudanças durante o cultivo. Entre essas, Kämpf (2001) cita a densidade, a porosidade, a disponibilidade de água e de ar do substrato. Os mesmo autor afirma que para

substratos, buscaram-se valores de porosidade total entre 0,75 - 0,90 m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup>, para melhor aeração, infiltração de água e drenagem.

**Tabela 2.** Atributos físicos\* dos substratos utilizados para germinação de sementes de *Hohenbergia stellata* Schultes f. e *Neoregelia sanguinea*. Cruz das Almas – BA, 2010.

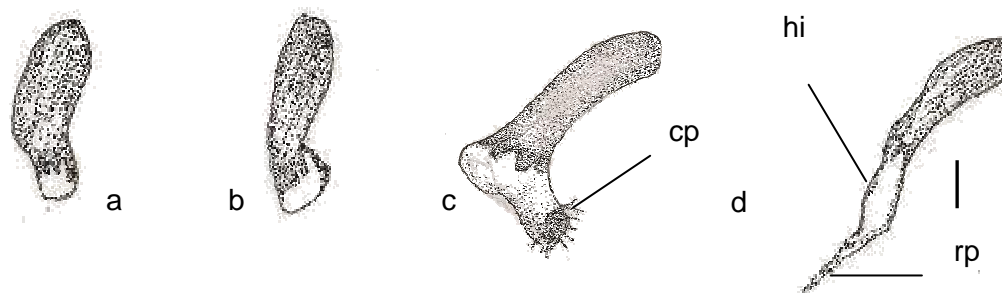
Substratos	Densidade (g.cm <sup>-3</sup> )	Porosidade total (%)	Capacidade de retenção de água (%)
Areia	1,80 a	20,44 b	12,68 b
Papel	0,32 ab	80,00 ab	57,50 ab
Plantmax <sup>®</sup>	0,65 ab	69,62 ab	26,27 ab
Vermiculita <sup>®</sup>	0,24 b	82,30 a	63,93 a

\*Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

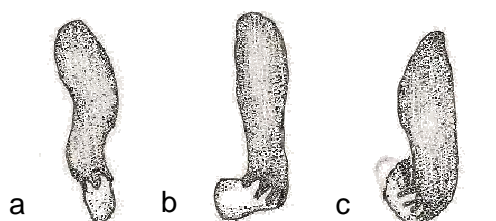
A germinação das sementes de *Hohenbergia stellata* Schultes f. foi iniciada aos quatro dias após a semeadura, pelo rompimento dos tegumentos e protrusão da raiz primária (Figura 2), independentemente do substrato. Quanto a *Neoregelia sanguinea* a germinação deu início aos cinco dias, em papel, ao sexto dia em Vermiculita<sup>®</sup> e Plantmax<sup>®</sup>, e ao sétimo dia em areia, pelo rompimento dos tegumentos (Figura 3) e protrusão da raiz primária. A estabilização da germinação foi verificada aos 11 dias de monitoramento para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. e aos 21 dias para a *Neoregelia sanguinea* (Figuras 4 e 5).

As duas espécies de Bromeliaceae estudadas nesse trabalho apresentam cotilédones que se elevam acima do nível do substrato durante o alongamento do hipocótilo, dessa forma a germinação de ambas foram caracterizadas como epígeal. As características que condicionam a germinação epígea em Bromeliaceae estão relacionadas com a tendência ao epifitismo e a ausência ou rara presença de feixes vasculares na bainha cotiledonar (BOYD, 1932). Além desses fatores, a maioria das espécies de bromélias estudadas apresenta exigência de luz para a germinação das sementes (MERCIER; GUERREIRO FILHO 1990; BENZING 2000).

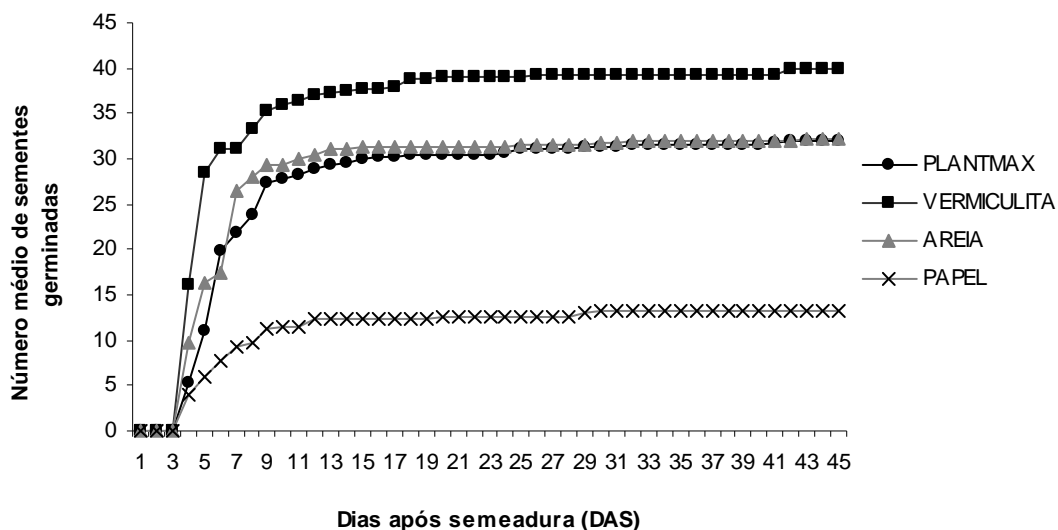
Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com Pereira (1988), pois a germinação epígea também foi encontrada por este mesmo autor em algumas espécies pertencentes à subfamília Bromelioideae.



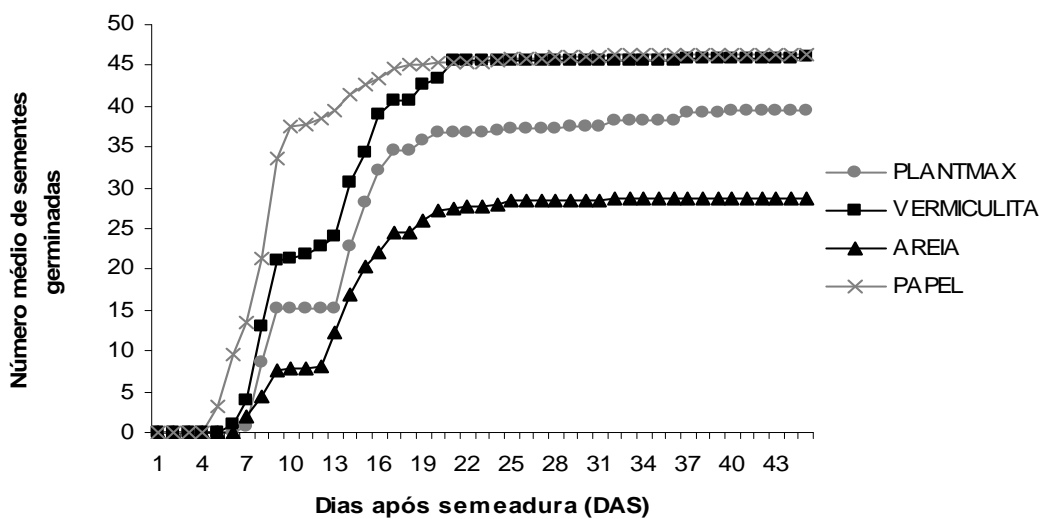
**Figura 2.** Aspecto do desenvolvimento pós-seminal de *Hohenbergia stellata* Schultes f.; Rompimento dos tegumentos após quatro dias do início da germinação (a-c); Protrusão da raiz primária seguida do hipocótilo aos 11 dias (d); cp: colo com pêlos; hi: hipocótilo; rp: raiz primária. Barra = 5mm. Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 3.** Aspecto da germinação de *Neoregelia sanguinea*; Rompimento dos tegumentos após cinco dias do início da germinação (a-c). Barra = 5mm. Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 4.** Número médio de sementes germinadas em relação ao tempo de germinação e diferentes substratos em *Hohenbergia stellata* Schultes f. Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 5.** Número médio de sementes germinadas em relação ao tempo de germinação e diferentes substratos em *Neoregelia sanguinea*. Cruz das Almas – BA, 2010.

Em sementes de *Aechmea nudicaulis* Griseb., *Neoregelia cruenta* (Graham) L. B. Sm. e *Vriesea neoglutinosa* Mez., o início das germinações ocorreu logo após o terceiro dia (MANTOVANI; IGLESIAS, 2005). Pereira et al. (2008), estudando morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de seis espécies de Bromeliaceae, verificaram que a germinação ocorreu entre o 3º e o 15º DAS para a maioria das espécies avaliadas. Os mesmos autores (PEREIRA et al., 2009a) estudando o comportamento germinativo de espécies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae relatam que a germinação iniciou-se em média aos 4-7 dias após semeadura, ao passo que Angelim et al. (2007) estudando a germinação e aspectos morfológicos de plantas de macambira (*Bromelia laciniosa*) averiguaram que a germinação ocorreu após o período de 33 dias. Informações como estas evidenciam diferenças fisiológicas das sementes entre as diversas espécies da família Bromeliaceae.

O substrato comercial Vermiculita<sup>®</sup>, proporcionou as maiores porcentagens de germinação e índice de velocidade de emergência para a bromeliácea *Hohenbergia stellata* Schultes f. No entanto, para a espécie *Neoregelia sanguinea* não foram observadas diferenças significativas quanto à porcentagem de germinação, porém índice de velocidade de emergência foi superior no substrato papel (Tabela 3). A capacidade de retenção de água desses substratos, reunida a características inerentes que regulam o fluxo de água para as sementes influenciaram os resultados, especificamente para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. De acordo com Mayer (1986), a temperatura, juntamente com a umidade do substrato e a luz, são os principais fatores que influenciam a germinação de sementes.

Alguns autores relatam que as propriedades físicas e químicas da Vermiculita<sup>®</sup> possibilitam uma alta capacidade de retenção de água e condições ideais de aeração, tornando-o um substrato adequado para utilização em ensaios de germinação (ANDRADE et al., 2000; ARAÚJO et al., 1991).

**Tabela 3.** Dados sobre \*IVG - índice de velocidade de germinação (Maguire 1962) e porcentagem de germinação em duas espécies de Bromeliaceae. Cruz das Almas – BA, 2010.

Espécie	Substrato			
	Areia	Plantmax®	Vermiculita®	Papel
<b>IVG</b>				
<i>Hohenbergia stellata</i>				
Schultes f.	68,03ab	51,66ab	87,47a	26,87b
<i>Neoregelia sanguinea</i>	36,92ab	63,41ab	64,87ab	78,86a
<b>Germinação (%)</b>				
<i>Hohenbergia stellata</i>				
Schultes f.	64,50ab	64,00ab	80,00a	26,50b
<i>Neoregelia sanguinea</i>	28,75a	39,50a	46,00a	46,25a

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

Nesse trabalho foi avaliada também a germinação sobre papel no escuro, que chegou a 90% para a *Hohenbergia stellata* Schultes f., diferindo estatisticamente do papel no claro (26,50%), e as plântulas apresentaram maior IVG (110,06). Para a *Neoregelia sanguinea* não foram verificadas diferenças significativas entre as condições de papel claro e escuro (25,0 %), no entanto o IVG foi inferior sob condição de escuro (28,18). Os resultados da germinação no escuro não foram incorporados às tabelas por apresentarem fontes de variação distintas dos substratos.

O mecanismo de detecção de qualidade e quantidade de luz pelo fitocromo pode explicar a prevenção à germinação em condições encontradas sob luz difusa de florestas fechadas (PONS, 2000). De acordo com Socolowski e Takaki (2004), sementes que possuem fitocromo A podem germinar tanto sob luz quanto no escuro, porém as que possuem apenas o fitocromo B só germinam em presença de luz. Silveira et al. (2004) estudaram a influência da luz e da temperatura, na germinação de *Marcetia taxifolia*, e classificaram esta espécie como fotoblástica positiva, uma vez que suas sementes responderam positivamente ao estímulo luminoso. Entretanto, também observaram que a germinação não foi restrita à presença de luz, visto que ocorreu no escuro contínuo, apesar de significativamente menor.

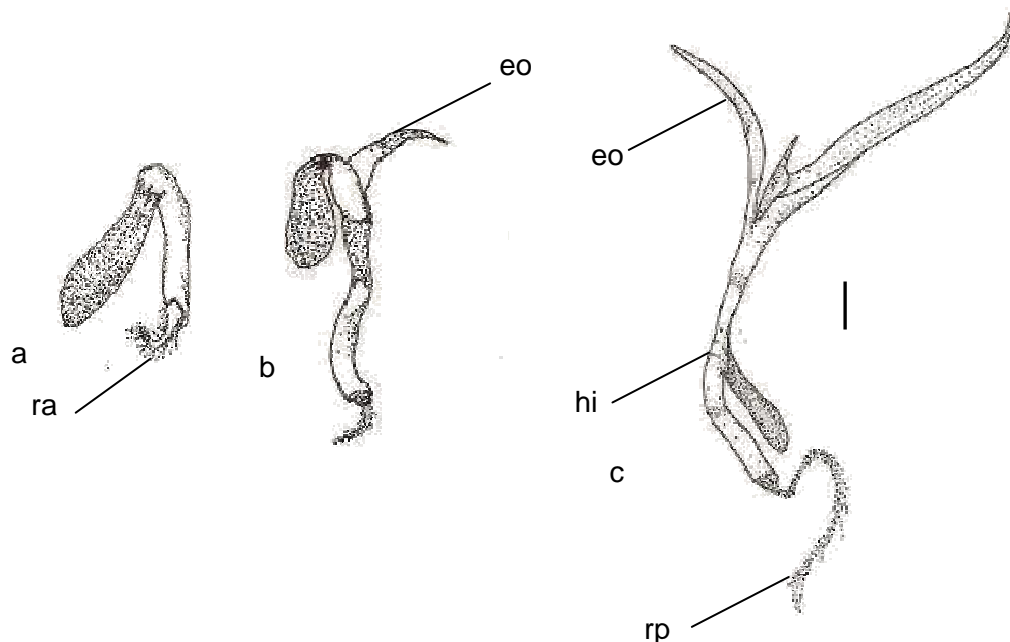
Vieira e Carvalho (1994) afirmam que a velocidade de germinação é um dos conceitos mais antigos de vigor de sementes. Lotes de sementes com porcentagens de germinação semelhantes, freqüentemente mostram diferenças em suas



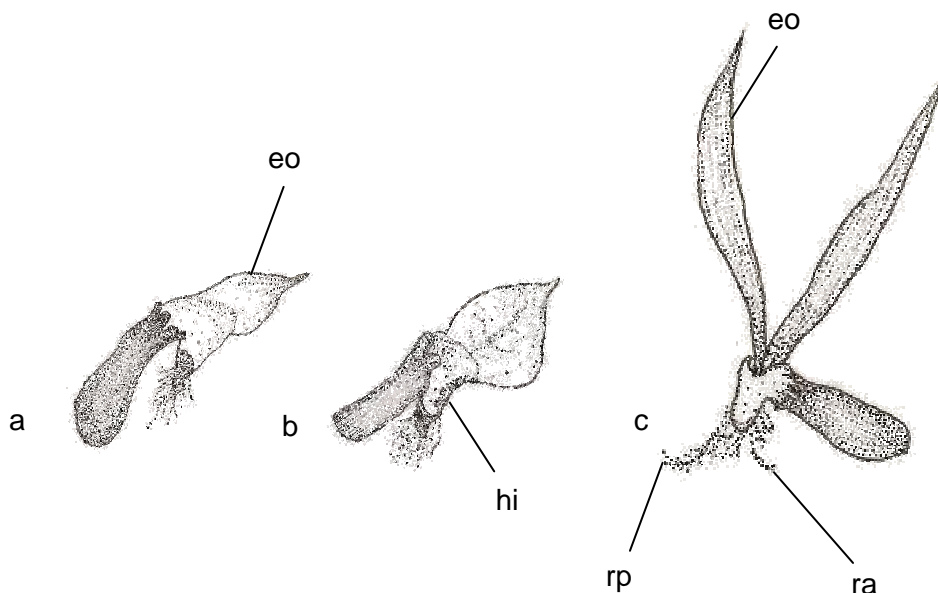
velocidades de germinação, indicando que existem diferenças de vigor entre eles, isto é, que há uma relação direta entre a velocidade de germinação e o vigor das sementes (KRZYZANOWSKI et al., 1999).

O início do desenvolvimento pós-seminal foi marcado pela emissão da raiz primária. A presença de plântulas normais e plântulas jovens (Figura 6) ocorreram em torno dos oito e 15 dias após semeadura para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. respectivamente. Para a *Neoregelia sanguinea* o surgimento de plântulas normais e jovens (Figura 7) aconteceram a partir do 12º e 20º dia após semeadura respectivamente.

Pereira et al. (2008) relatam o surgimento de plântulas normais em algumas espécies de Bromeliaceae entre o 8º e o 18º DAS e jovens entre o 12º e 30º DAS respectivamente. Entretanto Pereira (2009b) verifica que somente no 20º dia após a semeadura houve a formação de plântulas normais para a *Nidularium innocentii*, e no 21º dia para *Nidularium procerum*.



**Figura 6.** Morfologia do desenvolvimento pós-seminal da plântula de *Hohenbergia stellata* Schultes f. Plântula normal; oito dias após semeadura (a-b). Planta jovem; 15 dias após semeadura (c). hi: hipocótilo; eo: eófilo; rp: raiz primária; ra: raiz adventícia. Barra = 5mm. Cruz das Almas – BA, 2010.



**Figura 7.** Morfologia do desenvolvimento pós-seminal da plântula de *Neoregelia sanguinea*. Plântula normal 12 dias após semeadura (a-b). Planta jovem 20 dias após semeadura (c). hi: hipocótilo; eo: eófilo; rp: raiz primária; ra: raiz adventícia. Barra = 5mm. Cruz das Almas – BA, 2010.

Para comprimento de parte aérea (mm), comprimento de raiz (mm) e massa fresca (g) das plantas verifica-se que houve diferenças significativas entre os diferentes substratos testados. Com relação à parte aérea as melhores médias foram verificadas quando foi utilizado o Plantmax<sup>®</sup> como substrato para *Hohenbergia stellata* Schultes f. Quanto a *Neoregelia sanguinea* as maiores medias foram observados nos substratos Vermiculita<sup>®</sup> e Plantmax<sup>®</sup> (Tabela 4). Com relação a comprimento da raiz a Vermiculita<sup>®</sup> proporcionou o melhor desenvolvimento para as duas espécies estudadas, apesar de para a *Neoregelia sanguinea* não haver diferenças significativas em relação aos demais substratos (Tabela 5).

**Tabela 4.** Comprimento médio de parte aérea (mm) de duas espécies de Bromeliaceae em diferentes substratos. Cruz das Almas - BA, 2010.

Genótipo	Substrato			
	Papel	Areia	Plantmax <sup>®</sup>	Vermiculita <sup>®</sup>
<i>Hohenbergia stellata</i> Schultes f.	13,71c	36,95b	49,62a	39,68b
<i>Neoregelia sanguinea</i>	5,26b	7,61ab	9,02a	8,95a

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

**Tabela 5.** Comprimento médio de raiz (mm) de duas espécies de Bromeliaceae em diferentes substratos. Cruz das Almas - BA, 2010.

Genótipo	Substrato			
	Papel	Areia	Plantmax <sup>®</sup>	Vermiculita <sup>®</sup>
<i>Hohenbergia stellata</i> Schultes f.	12,18b	10,36b	6,24c	17,20a
<i>Neoregelia sanguinea</i>	1,96a	3,07a	2,96a	3,51a

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

O substrato Vermiculita<sup>®</sup> promoveu o maior desenvolvimento das plântulas de *Hohenbergia stellata* Schultes f. (Tabela 6), enquanto para a *Neoregelia sanguinea*, não foram observadas diferenças significativas entre os substratos Areia e Plantmax<sup>®</sup>

**Tabela 6.** Massa fresca (g) de duas espécies de Bromeliaceae em diferentes substratos. Cruz das Almas - BA, 2010.

Genótipo	Substrato			
	Papel	Areia	Plantmax <sup>®</sup>	Vermiculita
<i>Hohenbergia stellata</i> Schultes f.	0,013c	0,022b	0,019bc	0,041a
<i>Neoregelia sanguinea</i>	0,001b	0,007a	0,006a	0,005ab

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

Os coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) entre as médias de primeira contagem, germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de epicótilo, comprimento de raiz e massa fresca das espécies *Hohenbergia stellata* Schultes f. e *Neoregelia sanguinea* e os atributos dos substratos utilizados encontram-se nas Tabelas 7 e 8.

De acordo com os resultados da análise de correlação de Pearson pode-se inferir houve efeito fortemente positivo e significativo a 1% de probabilidade, para as duas espécies estudadas, em relação à capacidade de retenção de água (CRA) e porosidade total (POR). Os dados obtidos revelam que essas características são as que mais contribuem no armazenamento de água, possibilitando de certa forma a sua absorção pelas plantas.

O índice velocidade de germinação (IVG) da espécie *Hohenbergia stellata* Schultes f. correlacionou-se de forma fortemente positiva e significativa, a 1% probabilidade, com a primeira contagem de sementes germinadas (PCO) e com a porcentagem de germinação (GER). Entre a porcentagem de germinação (GER) e o índice velocidade de germinação (IVG), para esta mesma espécie, também ocorreu correlação fortemente positiva e significativa. Os dados obtidos indicam que estes fatores são diretamente proporcionais.

Para a *Neoregelia sanguinea*, em relação esses mesmos parâmetros, ocorreu correlação fortemente positiva e significativa, a 1% probabilidade, para o índice velocidade de germinação (IVG) em relação a primeira contagem (PCO) e a porcentagem de germinação (GER). Esses resultados evidenciam que, à medida que temos um maior número de sementes germinadas na primeira contagem e, conseqüentemente, maior porcentagem de germinação, aumenta-se o IVG sugerindo que estas sementes encontravam-se vigorosas na ocasião da realização do trabalho.

**Tabela 7.** Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os pares de caracteres para a espécie *Hohenbergia stellata* Schultes f. Cruz das Almas – BA, 2010.

	POR	CAP	PCO	GER	IVG	EPI	RAI	MAS
DEN	-0.08689 <sup>ns</sup>	-0.57729 <sup>ns</sup>	-0.17076 <sup>ns</sup>	0.11964 <sup>ns</sup>	0.05931 <sup>ns</sup>	0.65472 <sup>ns</sup>	-0.51299 <sup>ns</sup>	-0.22040 <sup>ns</sup>
POR		0.85331**	0.01772 <sup>ns</sup>	-0.10985 <sup>ns</sup>	-0.09878 <sup>ns</sup>	-0.00775 <sup>ns</sup>	-0.00920 <sup>ns</sup>	0.16302 <sup>ns</sup>
CAP			0.16005 <sup>ns</sup>	-0.09990 <sup>ns</sup>	-0.05864 <sup>ns</sup>	-0.27666 <sup>ns</sup>	0.32210 <sup>ns</sup>	0.35224 <sup>ns</sup>
PCO				0.85973**	0.91095**	0.27962 <sup>ns</sup>	0.61777 <sup>ns</sup>	0.45119 <sup>ns</sup>
GER					0.99178**	0.50146 <sup>ns</sup>	0.39000 <sup>ns</sup>	0.32505 <sup>ns</sup>
IVG						0.45673 <sup>ns</sup>	0.44802 <sup>ns</sup>	0.34451 <sup>ns</sup>
EPI							0.07758 <sup>ns</sup>	0.48664 <sup>ns</sup>
RAI								0.65658 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> = não-significativo; \*\* significativo a 1%, pelo teste t.

DEN = Densidade (g cm<sup>-3</sup>); POR = Porosidade Total (%); CAP = Capacidade de Retenção de Água (%); PCO = primeira contagem; GER = Germinação (%); IVG = Índice de velocidade de germinação (%); EPI = epicótilo (mm); RAI = Raiz (mm); MAS = Massa fresca (g)

**Tabela 8.** Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os pares de caracteres para a espécie *Neoregelia sanguinea*. Cruz das Almas – BA, 2010.

	POR	CAP	PCO	GER	IVG	EPI	RAI	MAS
DEN	-0.08689 <sup>ns</sup>	-0.57729 <sup>ns</sup>	-0.41358 <sup>ns</sup>	-0.17230 <sup>ns</sup>	-0.38371 <sup>ns</sup>	0.38979 <sup>ns</sup>	0.07874 <sup>ns</sup>	0.45871 <sup>ns</sup>
POR		0.85331**	0.71489 <sup>ns</sup>	0.71493 <sup>ns</sup>	0.75912 <sup>ns</sup>	-0.02188 <sup>ns</sup>	-0.08725 <sup>ns</sup>	-0.47658 <sup>ns</sup>
CAP			0.73718 <sup>ns</sup>	0.66785 <sup>ns</sup>	0.77958 <sup>ns</sup>	-0.13316 <sup>ns</sup>	-0.05238 <sup>ns</sup>	-0.56427 <sup>ns</sup>
PCO				0.58085 <sup>ns</sup>	0.85079**	-0.43403 <sup>ns</sup>	-0.20101 <sup>ns</sup>	-0.62549 <sup>ns</sup>
GER					0.90215**	-0.06399 <sup>ns</sup>	-0.09545 <sup>ns</sup>	-0.35028 <sup>ns</sup>
IVG						-0.31655 <sup>ns</sup>	-0.21225 <sup>ns</sup>	-0.56984 <sup>ns</sup>
EPI							0.76404 <sup>ns</sup>	0.75528 <sup>ns</sup>
RAI								0.69301 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> = não-significativo; \*\* significativo a 1%, pelo teste t.

DEN = Densidade (g cm<sup>-3</sup>); POR = Porosidade Total (%); CAP = Capacidade de Retenção de Água (%); PCO = primeira contagem; GER = Germinação (%); IVG = Índice de velocidade de germinação (%); EPI = epicótilo (mm); RAI = Raiz (mm); MAS = Massa fresca (g).

## CONCLUSÕES

O substrato Vermiculita<sup>®</sup> promove as melhores médias para a *Hohenbergia stellata* Schultes f. na maioria das variáveis analisadas;

Os substratos exercem pouco efeito sobre a germinação e sobre o vigor das plântulas de *Neoregelia sanguinea*;

As espécies *Hohenbergia stellata* Schultes f. e *Neoregelia sanguinea* possuem comportamento germinativo é do tipo epigeal;

O conhecimento da morfologia das sementes e plântulas de Bromeliaceae são ferramentas úteis para estudos taxonômicos, ecológicos e de tecnologia de sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANASTÁCIO, M. R.; SANTANA D. G. Características germinativas de sementes de *Ananas ananassoides* (Baker) L. B. Sm. (Bromeliaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 32, n. 2, p. 195-200, 2010.
- ANDRADE, A. C. S. et al. Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 609-615, 2000.
- ANGELIM, A. E. S.; MORAES, J. P. S.; SILVA, J. A. B.; GERVÁSIO, E R. C. R. G. Germinação e Aspectos Morfológicos de Plantas de Macambira (*Bromelia laciniosa*), encontradas na Região do Vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1065-1067. 2007.
- AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. Sementes florestais tropicais. **Abrates**. Brasília, 350p. 1993.
- ARAÚJO, P.S.R.; OLIVEIRA, F.J.; COSTA, M.C.B. Avaliação preliminar da germinação de sementes de feijões (alado e jacatupé). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 6, p. 857-861, 1991.
- BARROSO, M. B.; MARIM, M. P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999, 443p.
- BELTRATI, C. M. **Morfologia e anatomia de sementes**. Rio Claro: Departamento de Botânica da UNESP, 108p. 1994.
- BORGES, I. F.; GIUDENDE NETO, J. Del.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; BARBEDO, C. J. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 851-861, 2005.

- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 35 p. 1992.
- CAMPOS, V. TILLMANN, M. A. A. Avaliação da metodologia para teste de germinação em sementes de tomate. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 3, n. 1, p. 37-42, 1997.
- CARVALHO, N. M.; SOUZA FILHO, J. F. S.; GRAZIANO, T. T.; AGUIAR, I. B. Maturação fisiológica de sementes de amendoim-do-campo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, n. 2, p. 23-28, 1980.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.
- COMPTON, R. H. Investigation of the seedling structure in the Leguminosae. **Journal of the Linnean Society of London Botany** 41:1-122. 1912.
- FENNER, M. **Seed Ecology**. New York, Chapman e Hall. 151p. 1985.
- GARDNER, F. P.; PEARCE, R. B.; MITCHEL, R. L. Physiology of crop plants. **Ames: Iowa State Univ**. 327p. 1985.
- FRETZ, T. A. READ, P. E. PEELE, M. C. **Plant propagation Lab Manual**. Mineapolis: Burgess Publishiny Company, 317 p. 1979.
- GARWOOD, N. C. Studies in Annonaceae. XX. Morphology and ecology of seedlings, fruits and seeds of selected Panamanian species. **Botanische Jahrbücher für Systematik**. 117:1-152. 1995.
- GENTIL, D. F. O. Conservação de sementes do cafeeiro: Resultados discordantes ou complementares. **Bragantia**. v.60, n.3, p. 149-154. 2001.
- KAMPF, A. N. Substratos para floricultura: manual de floricultura. In: Simpósio Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Maringá. **Anais...** Maringá: UFPR, p. 36-43. 1992.
- KÄMPF A. N. **Análise física de substratos para plantas**. Viçosa: SBCS. 26: 5-7 (Boletim Informativo). 2001.
- KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com Araucaria**. 1983. Curitiba, UFPR, 233p. (Dissertação de mestrado). 1983.
- LUTHER, H. E. An alphabetical list of Bromeliad Binomials, 10<sup>th</sup> ed. **The Bromeliad Society International**, Sarasota. 2006.
- MAGUIRE, J. B. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

- MANTOVANI, A.; IGLESIAS, R. R. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 73-84, 2005.
- MAYER, A. M. How do seeds their environment? some biochemical aspects of the sensing of water potencial, light and temperature. **Israel Journal of Botany**, 35:3-16, 1986.
- MELO, F. P. L.; AGUIAR NETO, A. V.; SIMABUKURO, E. A.; TABARELLI, M.. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. p. 237-249. In: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed. 2004.
- MELO, M. F. F.; VARELA, V. P. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, germinação e plântulas de duas espécies florestais da Amazônia *Dinizia excelsa* Ducke (Angelim Pedra) e *Cedrelingacatenaeformis* Ducke (Cedrorana) Leguminosae: Mimosoideae. **Revista Brasileira de Sementes** 28: 54-62. 2006.
- MERCIER, H.; GUERREIRO FILHO, O. Sexual propagation of some native bromeliads of Mata Atlântica: effect of light and temperature on germination. **Hoehnea**, v.17, p.19-26, 1990.
- NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M. Determinação do grau de umidade de sementes de ipê-dourado *Tabebuia ochracea* ((Cham.) Standl.) pelos métodos de estufa e forno de microondas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n.6, p. 1299-1305, 2004.
- PAULA, C. C.; Silva, H. M. P. 2004. **Cultivo prático de bromélias**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.
- PEREIRA, T. S. Bromelioideae (Bromeliaceae): morfologia do desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro v. 29, p. 115-154, 1988.
- PEREIRA, A. R.; PEREIRA, T. S.; RODRIGUES, A. S.; ANDRADE, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. **Acta Botanica Brasileira**. São Paulo v22, n.4. p.1150-1162. 2008.
- PEREIRA, A. R.; ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S.; FORZZA, R. C.; RODRIGUES, A. S. Comportamento germinativo de espécies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v.32, n.4. São Paulo. 2009a.
- PEREIRA, C. **Ponto de colheita de frutos, qualidade e armazenamento de sementes de *Nidularium innocentii* (Lem.) e *Nidularium procerum* (Lindm)**. 2009.



- 79f. (Dissertação de Mestrado) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2009b.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed., Piracicaba: ESALQ, 477 p. 2000.
- PONS, T.L. Seed responses to light. *In* Seeds: the ecology of regeneration in plant communities. (M. Fenner, ed.). **CABI Publishing, Wallingford**, p.237-260. 2000.
- OLIVEIRA, D. M. T. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de *Phaseoleae*, *Sophoreae*, *Swartzieae* e *Tephrosieae*. **Revista Brasileira de Botânica** **24**: 85-97. 2001.
- RAMOS, A.; BIANCHETTI, A. Metodologia para determinação do teor de umidade de sementes de *Araucária angustifolia* (Bert.) Kuntze. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 3, p. 9-16, 1990.
- ROSA, L. S.; FELIPPI, M.; NOGUEIRA, A. C. GROSSI, F. Avaliação da germinação sob diferentes potenciais osmóticos e caracterização morfológica da semente e plântula de *Ateleia glazioviana* Baill (Timbó). **Cerne** **11**: 306-314. 2005.
- SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação**: um enfoque estatístico. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 248 p. 2004.
- SILVEIRA, F. A. O.; NEGREIROS, D.; FERNANDES, G. W. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Marsetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.847-851, 2004.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. 1974. Pticairnioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica**. Monograph nº14. Part 1. New York: ON - Hafner Press, 658 p. 1974.
- SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don - Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 785-792, 2004.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2.ed. McGraw Hill, New York. 1980.
- TORRES, E. B. Identificación de plantulas de algunas especies arboreas del bosque de Niebla. **Perez-Arbelaezia**. 1:39-95. 1985.
- VERDONCK, O; VLEESCHAUWER, D; DE BOODT, M. The influence of the substrate to plant growth. **Acta Horticulturae**. 126: 251-258.1981.
- VIEIRA, R. D.; CARVALHO, M. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação de recursos genéticos vegetais dos biomas tropicais é um tema de importância mundial. Um dos grandes desafios da humanidade é desenvolver estratégias e tecnologias que permitam promover o desenvolvimento social e econômico das inúmeras regiões do planeta sem destruir a importante biodiversidade que serve de base para a própria sobrevivência humana. O desafio é gigantesco, pois o impacto humano sobre o ambiente natural é significativo e crescente (MEFFE, 1997).

Vítimas das devastações de seus habitats naturais, perseguidas por serem acusadas de facilitar a proliferação de insetos responsáveis pela transmissão de doenças como malária e dengue, as plantas da família Bromeliaceae, como plantas ornamentais, alcançam bom preço no mercado e, por isso, a procura por espécies é cada vez maior estimulando à coleta predatória, levando conseqüentemente à extinção.

O processo de extinção está relacionado ao desaparecimento de espécies em um determinado ecossistema e ao longo do tempo, o homem vem acelerando muito a taxa de extinção de espécies, a ponto de ter-se tornado, atualmente, o principal agente da perda de valiosos recursos genéticos como no caso das Bromeliaceae.

Existem muitas limitações para a exploração comercial das Bromeliaceae visto que a produção de bromélias para comercialização é lenta e difícil, ou seja, não compensa. As técnicas de multiplicação *in vitro* bem como de conservação *in vitro* constituem-se em métodos valiosos para a conservação de recursos genéticos vegetais (HARDING et al., 1997).

O conhecimento da morfologia da semente bem como do desenvolvimento pós-seminal contribui para a caracterização de grupos taxonômicos (ROSA et al., 2005), podendo auxiliar nas análises de germinação e conservação de sementes bem como em pesquisas sobre recuperação de ecossistemas naturais; uma vez que a emergência e o estabelecimento das plântulas são estágios críticos no ciclo de vida das plantas (MELO et al. 2004).

Com o intuito de estabelecer um protocolo de multiplicação *in vitro* e conservação *in vitro* de espécies de Bromeliaceae bem como conhecer sua germinação e plântula, avaliando diferentes substratos, foi realizado o presente estudo sendo os resultados obtidos de grande relevância para a reposição e preservação dos

recursos genéticos destas espécies, pois, envolve a multiplicação e conservação *in vitro*, a germinação e o desenvolvimento pós-seminal de bromélias.

O protocolo de multiplicação e conservação *in vitro* estabelecido nesse trabalho poderá servir como ponto de partida para estudos mais aprofundados sobre as espécies *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*.

Os estudos com relação à germinação e desenvolvimento pós-seminal de *Hohenbergia stellata* Schultes f. e *Neoregelia sanguinea* fornecerão informações sobre a família Bromeliaceae que contribuirão para sua domesticação e conservação. Entretanto, é importante ressaltar a necessidade de maiores investimentos em pesquisas, campanhas de conscientização em relação ao potencial para utilização das espécies da flora nativa brasileira de forma sustentável, a fim de promover a preservação do patrimônio genético e da biodiversidade para as futuras gerações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HARDING, K.; BENSON, E.E.; CLACHER, K. Plant conservation biotechnology : An overview. **Agro-Food- Industry Hi-Tech**, may-june, 1997.
- MEFFE, G. K. (ed.). Principles of Conservation Biology. Sunderland: Sinauer Associates. 1997.
- ROSA, L. S.; FELIPPI, M.; NOGUEIRA, A. C. GROSSI, F. Avaliação da germinação sob diferentes potenciais osmóticos e caracterização morfológica da semente e plântula de *Ateleia glazioviana* Baill (Timbó). **Cerne** 11: 306-314. 2005.
- MELO, F. P. L.; AGUIAR NETO, A. V.; SIMABUKURO, E. A.; TABARELLI, M.. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. p. 237-249. In: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed. 2004.