



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA**  
**CCA335- TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**



Daniela de Andrade Silva Max

**Conservação *In Vitro* de Bromélias em Condições de Crescimento Lento**

Cruz das Almas

Julho - 2019

**Daniela de Andrade Silva Max**

**Conservação *In Vitro* de Bromélias em Condições de Crescimento Lento**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para a conclusão do Componente Curricular CCA 335 – Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso de Bacharelado em Biologia, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Orientadora: Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Coorientadores: Dr. Everton Hilo de Souza

Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Cruz das Almas

Julho - 2019

## ***AGRADECIMENTOS***

“Sonho que se sonha só é só um sonho. Sonho que se sonha junto é realidade”... Isso só foi possível graças o apoio de muitas pessoas envolvidas. Primeiramente agradeço a Deus por escrever esse capítulo no meu livro de vida, a minha família que sempre foi a minha base, cheguei aqui por eles. Principalmente a meu pai Daniel (In memoriam) que não está mais comigo, mas sei o quanto ele se orgulhou por ter sua filha cursando uma Universidade Federal, o quanto ele se preocupava com meus estudos, não parei pai! Continuarei seguindo seus passos e seus ensinamentos, obrigada por ter sido meu pai, meu melhor amigo!

Minha mãe Alaíde, por ser essa mulher forte que sempre correu atrás do que queria e por ter criado seus três filhos com dedicação, somos o que somos graças a ela! Meu esposo Anderson por estar sempre do meu lado me apoiando e compreendendo as minhas ausências, às vezes. Meu filho Dylan minha razão de viver, por ser tão companheiro e entender minhas faltas nas horas precisas, espero ter valido apenas essas ausências pra ser um exemplo pra você. Meus irmãos Sandro e Simone, meus melhores exemplos de honestidade, comprometimento e responsabilidade, essa conquista é de vocês também! Meus sobrinhos amados Grazielly, Alexandre, amo vocês, sigam sempre o coração de vocês, e Adriellen que você brilhe sempre, continue sendo essa menina determinada. Minha cunhada Gaby, amiga de sempre desde a infância muita história pra contar! A Erico Almeida, por ser tão presente na minha vida e estar sempre do meu lado. A todos os familiares que estiveram presentes seja de forma direta ou indireta e que sei que torceram muito por mim, meu muito obrigada!

Aos meus orientadores, Profa. Maria Angélica, Prof. Everton Hilo e Profa. Fernanda Vidigal, serei eternamente grata a vocês por todos os ensinamentos, pela parceria e principalmente por acreditarem em mim, vocês foram anjos enviados no momento que mais precisei, muito obrigada!

A todos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa, por me receberem de braços abertos, aprendo mais todos os dias com cada um, vocês são demais! Iasmin, por ser minha parceira nesse trabalho, por ser tão eficiente e comprometida, não teria conseguido sem sua ajuda, a Rafaelle por está disposta a ajudar e se preocupar com todos, a Simone Sacramento pessoa de alto astral, sorriso largo, me acompanhando desde os estágios supervisionados, tornando-se uma grande amiga.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por todo seu espaço físico, pelos professores, aos quais agradeço pelos conhecimentos adquiridos.

Aos meus amigos que foram mais que presentes nessa caminhada, Larissa, Iara, Taize, Suelen, Camila, Jadson, Antônia, vocês foram peças fundamentais, sempre do meu lado, segurando minha mão nos momentos mais difíceis, sabemos bem o que passamos ao longo desse curso. Lívia, Marcos e Samara, iniciamos o curso juntos, mas nunca fomos tão próximos quanto nos últimos semestres. A todos do grupo “Arrasadores Arrasados” vocês são demais, sempre me colocando pra cima, em especial Fernanda e Géssica, por toda atenção e carinho comigo. Minha amiga Aline Gonçalves, “minha Parma favorita” por vibrar por cada apresentação de supervisionado e cada semestre finalizado, serei sua Bióloga agora! Enfim, a todos que acompanharam essa minha trajetória, sei que são tantos que querem meu bem e torcem por mim, se não os citei não foi por esquecimento, mas por haver tantas pessoas a quem agradecer. Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

MAX, DANIELA DE ANDRADE SILVA. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Julho de 2019. Conservação *In Vitro* de Bromélias em Condições de Crescimento Lento. Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, Coorientadores: Everton Hilo de Souza e Fernanda Vidigal Duarte Souza.

A família Bromeliaceae concentra espécies de plantas tipicamente tropicais e subtropicais das Américas. Grande parte desses exemplares ocorre naturalmente no Brasil, onde está um dos centros de diversidade da família. A maioria das espécies dessa família possui alto potencial ornamental, devido à grande variabilidade de cores e formas que apresentam, tornando-as responsáveis por um volume comercial significativo no ramo da floricultura. Além disso, diversas espécies da família estão em diferentes listas vermelhas de ameaça. Portanto, o objetivo do presente trabalho é estabelecer um Banco de Germoplasma *in vitro* de bromélias com a finalidade de conservação dessas espécies em condições de crescimento lento. Sementes de 57 espécies de bromélias de diferentes subfamílias foram estabelecidas em meio de cultura MS com metade da concentração de sais. As avaliações foram realizadas diariamente para verificar o início da germinação. Após 60 dias de estabelecidas, foram avaliadas a porcentagem de germinação e porcentagem de contaminação considerando fungos e bactérias. Para os ensaios de conservação 48 espécies foram mantidas em dois ambientes de cultivo (sala de conservação =  $19 \pm 1$  °C e sala de crescimento =  $26 \pm 1$  °C) e duas concentrações de sais de MS. Aos seis meses de conservação das plântulas foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta em cm, número de folhas verdes, número de folhas senescentes, número de raízes. De forma geral a concentração de sais MS não influenciou diretamente no desenvolvimento das plantas conservadas. As plantas incubadas em sala de conservação a uma temperatura  $19 \pm 1$  °C apresentaram menor altura e número de raízes. Foi possível conservar 48 espécies de bromélias por um período de seis meses sem a necessidade de repicagem. A plasticidade genotípica deve ser levada em consideração quando se pensa na conservação do germoplasma de bromélia.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae. Cultura de Tecidos. Germinação de sementes. Condições de conservação.

## ABSTRACT

MAX, DANIELA DE ANDRADE SILVA. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Julho de 2019. *In Vitro* Conservation of Bromeliads in Slow Growth Conditions. Advisor: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, Coadvisor: Everton Hilo de Souza e Fernanda Vidigal Duarte Souza.

The Bromeliaceae concentrates species of plants typically tropical and subtropical of the Americas. Most of these specimens occur naturally in Brazil, where one of the family centers of diversity remains. Most of the individuals of this family display high ornamental potential, due to the great variability of colors and forms, making them responsible for a significant commercial volume in the floriculture branch. In addition, several species of the family are on different red lists of threat. The objective of the present work is to establish an *in vitro* germplasm bank of bromeliads for the purpose of conservation of these species under conditions of slow growth. Seeds of 57 species of bromeliads from different subfamilies were established in MS culture medium. Evaluations were carried out daily to verify the onset of germination. After 60 days of establishment, the percentage of germination and percentage of contamination were evaluated considering fungi and bacteria. For the conservation trials, 48 species were established at two growing temperatures (conservation room =  $19 \pm 1$  ° C and growth room =  $26 \pm 1$  ° C) and two concentrations of MS salts. Six months after planting, the following variables were evaluated: plant height in cm, number of green leaves, number of senescent leaves and number of roots. In general, the concentration of MS salts did not directly influence the development of the conserved plants. The plants incubated in a conservation room at a temperature of  $19 \pm 1$  °C showed reduction of the cellular metabolism and consequently lower plant height and number of roots. It was possible to conserve 48 species of bromeliads for a period of six months without the need of subculture. Genotypic plasticity should be taken into account when considering the conservation of bromeliad germplasm.

**Keywords:** Bromeliaceae. Tissue culture. Germination of seeds. Storage conditions.

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO .....	01
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	03
2.1 <i>Material vegetal</i> .....	03
2.2 <i>Germinação in vitro das sementes</i> .....	06
2.3 <i>Conservação in vitro</i> .....	07
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	08
3.1 <i>Germinação in vitro das sementes</i> .....	08
3.2 <i>Conservação in vitro</i> .....	13
4 CONCLUSÕES .....	23
REFERÊNCIAS .....	23

## 1. INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é típica das zonas tropicais e subtropicais, apresentando 75 gêneros e cerca de 3.590 espécies, constituindo-se na maior família de distribuição natural restrita ao Novo Mundo, com exceção da *Pitcairnia feliciana* (Aug.Chev.) Harms & Mildbr, nativa da Guiné (GOUDA et al., 2019). Essa família é constituída de uma variedade de formas de vida como as epífitas que são a grande maioria, as terrestres e rupícolas (MARTINELLI et al., 2008).

A área de maior ocorrência natural das Bromeliaceae expande-se desde os estados da Virginia, Texas e Califórnia nos EUA, até a Argentina (REITZ, 1983). Estima-se que 40% das espécies e 73% dos gêneros ocorram no Brasil (LEME; MARIGO, 1993). Essas espécies apresentam importância ecológica por ser fonte de recursos para a vida selvagem, servindo de abrigo para reprodução e instalação de uma flora e fauna (BALKE et al., 2008). A beleza das folhas e flores confere à essas plantas valor ornamental, e por isso são cultivadas e utilizadas em projetos paisagísticos e em decorações de interior (DAL VESCO et al., 2011).

As espécies de bromélias estão ameaçadas de extinção, principalmente, devido à destruição de seu habitat natural, como a Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Amazônia (FORZZA et al., 2012; 2013) e à exploração extrativista, para suprir a demanda crescente destas no mercado de plantas ornamentais. Essa perda significativa na biodiversidade afeta principalmente as espécies epífitas, que são a maioria das bromélias (WANDERLEY; MARTINS, 2007).

As bromélias são alvo para vendas comerciais a partir de atividades extrativistas, já que não existe nenhum sistema para produção de mudas em larga escala, a fim de atender às demandas do mercado. Uma das estratégias para combater o extrativismo predatório seria o desenvolvimento de um sistema de produção de mudas em larga escala. Nesse sentido, uma técnica promissora é a micropropagação, também conhecida como multiplicação *in vitro*, a qual possibilita a obtenção de um grande número de mudas, com alta qualidade fitossanitária, em um pequeno espaço físico e curto espaço de tempo (CARVALHO et al., 2006).

Considerada como uma das técnicas de cultura de tecidos, a multiplicação *in vitro* tem muito a oferecer como alternativa à propagação vegetativa convencional, sendo uma ferramenta eficiente na propagação em larga escala (CARVALHO et al., 2006).



O cultivo *in vitro* além de proporcionar a propagação em larga escala, é, também a base para o estabelecimento e manutenção de um banco de germoplasma *in vitro* (ROCA et al. 1991). A conservação *in vitro* consiste na manutenção das plantas em meio de cultura em condições de crescimento lento sob condição laboratoriais controladas e pela manipulação de diferentes fatores que reduzam o metabolismo da planta. Um protocolo eficiente deve garantir a identidade genética do material e sua qualidade fitossanitária (ALMEIDA et al., 2002; ENGELMANN, 2011).

Vários são os fatores que podem ser manipulados para a redução do metabolismo das plantas *in vitro*, destacando-se alterações nos meios de cultivo, que podem ir desde o uso de reguladores osmóticos, vegetais ou a redução de sais e outros elementos. Fatores relacionados à forma de incubação, incidência de luz, fotoperíodo, temperatura, dentre outros, costumam ter forte influencia sobre o crescimento das plantas e são largamente usados para a conservação *in vitro*, buscando a redução do metabolismo da planta e, conseqüentemente retardando seu desenvolvimento (ENGELMANN, 2011; REED et al., 2013).

Segundo VALOIS et al. (2001), a conservação *in vitro* apresenta diversas vantagens em relação à conservação em campo, como o menor risco de perda do germoplasma por fatores, tanto bióticos, quanto abióticos e a disponibilidade imediata para a propagação e a facilidade para o intercâmbio.

Apesar de sua praticidade, a conservação *in vitro* requer estudos de adequação para qualquer material novo (ENGELMANN, 2011). Alguns relatos bem-sucedidos de crescimento lento para as bromélias pode ser observado em *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra (FREITAS et al., 2015), *Alcantarea imperialis* Harms (MOLLO et al., 2011), *Nidularium minutum* Mez (CARVALHO et al., 2013) e *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (SILVA, 2018).

Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com base na hipótese de que é possível conservar *in vitro* espécies de bromélias sob condições de crescimento lento obtidas a partir de alterações nos meios de cultivo e nas condições de incubação.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram: *i*) estabelecer um Banco de Germoplasma *in vitro* de bromélias com a finalidade de conservação dessas espécies em regime de crescimento lento; *ii*) avaliar a introdução e a germinação *in vitro* de diferentes espécies de bromélias; *iii*) avaliar duas concentrações de sais do meio de cultura MS e duas temperaturas de cultivo (sala de conservação =  $19 \pm 1$  °C e sala de

crescimento =  $26 \pm 1$  °C) para a conservação *in vitro* das diferentes espécies de bromélias, seis meses após o estabelecimento.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***2.1 Material vegetal***

Foram utilizadas para os ensaios de germinação sementes obtidas de bagas e /ou cápsulas maduras de 57 espécies de diferentes gêneros e subfamílias de Bromeliaceae: 29 espécies de Bromelioideae, 16 de Tillandsioideae e 12 de Pitcairnioideae, conforme a Tabela 1 abaixo. E para os ensaios de conservação foram utilizadas 48 espécies dentre as citadas na tabela. As sementes foram coletadas aleatoriamente, no início da deiscência em populações de ambiente natural, de forma a abranger a variabilidade genética da espécie e levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde foram cultivadas em meio de cultura.

Tabela 1: Espécies estabelecidas e conservadas *in vitro*, classificadas por subfamílias.

Acesso	Espécies
<b>Bromelioideae</b>	
BGB-006	<i>Neoregelia camorimiana</i> Pereira & I.A.Penna
BGB-008	<i>Canistropsis seidelii</i> (L.B. Smith & Reitz) Leme
BGB-030	<i>Aechmea blanchetiana</i> (Baker) L. B. Smith
BGB-034	<i>Hohenbergia blanchetii</i> (Baker) Mez
BGB-073	<i>Hohenbergia castellanosi</i> L.B.Sm. & Read
BGB-132	<i>Hohenbergia stellata</i> Schult. & Schult.f.
BGB-197	<i>Billbergia nutans</i> H.Wendl.
BGB-214	<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker
BGB-248	<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm.
BGB-284	<i>Araeococcus</i> sp.
BGB-318	<i>Billbergia</i> sp.
BGB-351	<i>Acanthostachys strobilacea</i> Link, Klotzsch, & Otto
BGB-363	<i>Nidularium procerum</i> Lindm.
BGB-391	<i>Neoregelia laevis</i> L.B.Sm.
BGB-394	<i>Neoregelia odorata</i> Leme
BGB-418	<i>Billbergia zebrina</i> Lindl. var. Alba

BGB-420	<i>Sincoraea burle-marxii</i> (L.B.Sm. & Read) Louzada & Wand.
BGB-463	<i>Aechmea mertensii</i> (Meyer) Schult. & Schult.f.
BGB-471	<i>Hohenbergia</i> Schult. & Schult.f.
BGB-500	<i>Araeococcus</i> sp.
BGB-522	<i>Orthophytum rubrum</i> L.B.Sm.
BGB-528	<i>Billbergia</i> sp.
BGB-556	<i>Hohenbergia igatuensis</i> Leme
BGB-557	<i>Hohenbergia pennae</i> Pereira
BGB-566	<i>Sincoraea</i> sp.
BGB-794	<i>Hohenbergia salzmännii</i> (Baker) E.Morren ex Mez
BGB-855	<i>Aechmea aquilega</i> (Salisb.) Griseb.,
BGB-856	<i>Hohenbergia catinae</i> Ule
BGB-857	<i>Hohenbergia augusta</i> (Vell.) E.Morre)

---

**Tillandsioideae**

---

BGB-016	<i>Tillandsia stricta</i> Sol. ex Sims
BGB-036	<i>Tillandsia tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i> (Wawra) L.B.Sm.
BGB-157	<i>Vriesea fosteriana</i> L.B.Sm.
BGB-217	<i>Tillandsia pohliana</i> Mez
BGB-230	<i>Vriesea procera</i> Wittm.

BGB-261	<i>Tillandsia polystachia</i> (L.) L.
BGB-292	<i>Tillandsia heubergeri</i> Ehlers.
BGB-374	<i>Vriesea drepanocarpa</i> Mez
BGB-383	<i>Vriesea scalaris</i> E. Morren
BGB-460	<i>Vriesea minuta</i> Leme
BGB-620	<i>Vriesea</i> sp.
BGB-623	<i>Mezobromelia</i> sp.
BGB-668	<i>Tillandsia loliacea</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.
BGB-669	<i>Tillandsia juncea</i> (Ruiz & Pav.) Poir.
BGB-706	<i>Catopsis berteroniana</i> (Schult.f.) Mez
BGB-730	<i>Catopsis sessiliflora</i> (Ruiz & Pav.) Mez)

---

**Pitcairnioideae**

---

BGB-083	<i>Dyckia leptostachya</i> Baker
BGB-196	<i>Dyckia brevifolia</i> hor. ex Baker
BGB-198	<i>Dyckia secunda</i> L.B.Sm.
BGB-200	<i>Dyckia beateae</i> E.Gross & Rauh
BGB-201	<i>Dyckia fosteriana</i> L.B.Sm.
BGB-202	<i>Dyckia monticola</i> L.B.Sm. & Reitz
BGB-203	<i>Dyckia bracteata</i> Mez

BGB-208

*Dyckia paucispina* Leme & Esteves

BGB-210

*Dyckia formosensis* Leme & Z.J.G.Miranda

BGB-642

*Dyckia marnier-lapostollei* L.B.Sm.

BGB-676

*Dyckia ferox* Mez

BGB-858

*Pitcairnia* sp.

---



**Figura 1.** Diversidades de espécies de Bromeliaceae utilizadas nos experimentos de germinação e conservação *in vitro*. A) *N. camorimiana*; B) *C. seidelii*; C) *D. fosteriana*; D) *A. multiflora*; E) *Araeococcus* sp.; F) *T. heubergeri*; G) *Billbergia* sp.; H) *A. strobilacea*; I) *S. burle-marxii*; J) *V. minuta*; K) *A. mertensii*; L) *O. rubrum*; M) *Hohenbergia penna*; N) *Mezobromelia* sp.; O) *Catopsis berteroniana*; P) *Pitcairnia* sp.

## ***2.2 Germinação in vitro das sementes***

Sementes de 57 espécies foram removidas dos frutos manualmente e os apêndices plumosos (spp. Tillandsioideae), mucilagem (spp. Bromelioideae) e alados (spp. Pitcairnioideae) envolvendo as sementes foram removidos com auxílio de pinça e papel toalha para evitar a proliferação de microrganismos.

As sementes foram lavadas em água corrente com detergente neutro, e posteriormente imersas em solução de etanol 70 % por 5 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (2 % de cloro ativo) e água destilada com três gotas de detergente Tween-20®, durante 30 minutos, seguida de três lavagens em água destilada autoclavada.

Foram estabelecidas duas sementes por tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 15 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com metade da concentração dos sais, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121 °C por 20 minutos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 horas, com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

As avaliações foram realizadas diariamente para verificar o início da germinação. Após 60 dias de estabelecidas, foram avaliadas a porcentagem de germinação e porcentagem de contaminação (fungo e bactéria).

A emergência da raiz primária (1 mm) foi o critério usado para se considerar o início da germinação (PEREIRA et al., 2008). O número de sementes utilizado para a germinação variou conforme a disponibilidade (14 a 60).

## ***2.3 Conservação in vitro***

Plântulas das diferentes espécies de bromélias, após 60 dias de germinadas, foram reduzidas a um tamanho de aproximadamente 1 cm, removendo-se parte das folhas e raízes, permanecendo apenas a região do caule com o meristema apical, a fim de tornar homogêneo o material de partida. As plântulas foram estabelecidas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL do meio de cultura MS completo ou com metade da concentração dos sais (½ MS), suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, onde permaneceram por seis meses sob duas temperaturas (sala de conservação = 19 ± 1 °C e sala de crescimento = 26 ± 1 °C) com intensidade luminosa de 22 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 12 horas.



Após seis meses do estabelecimento das foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta (ALT) em cm, número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de raízes (NRA).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial desbalanceado (2 x 2 x 48), sendo 2 concentrações de sais MS (MS e ½ MS) x 2 ambientes (sala de conservação -  $19 \pm 1$  °C e sala de crescimento -  $26 \pm 1$  °C) e 48 espécies. O número de repetições variou de 4 a 15 por tratamento, a depender da disponibilidade, sendo cada repetição constituída de uma plântulas por tubo.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias de probabilidade foram comparadas pelo teste *F* a 5 % para meio de cultura e temperatura, a as medias das espécies foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5 %, utilizando o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2004). As variáveis NFV, NFS, NRA foram transformadas em arc sen ( $\sqrt{x/100}$ ) visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Germinação *in vitro* das sementes

Foi possível o estabelecimento *in vitro* de 87,72 % das espécies de bromélias, com porcentagens de germinação variando de 7% (BGB-034 e BGB-623) a 100 % (BGB-217 e BGB418). Das 57 espécies, apenas sete não germinaram, sendo todas da subfamília Tillandsioideae (BGB-036, BGB-230, BGB-374, BGB-460, BGB-706 e BGB-730) com exceção do BGB-566 que pertence à subfamília Bromelioideae (Tabela 1).

As sementes de Tillandsioideae são menores quando comparadas as demais subfamílias (BENZING, 2000), possuindo assim um menor aporte de reserva nutricional, mesmo estando em um meio de cultura suplementado, as espécies se comportaram *in vitro* dessa mesma forma. As menores porcentagens de germinação de *Vriesea bahiana* Leme, *Vriesea gigantea* Gaudich. e *Vriesea philippocoburgii* Wawra são relatadas por SILVA (2018) e DROSTE et al. (2005). Esses autores reportam que sementes dessa subfamília apresentam baixas porcentagens de germinação quando comparadas às outras subfamílias em condições naturais. As sementes de BGB-566

foram coletadas em campo com inflorescências secas após queimada, já que a região é muito propícia a esses acontecimentos, o que pode justificar a ausência de germinação.

O poder germinativo elevado para algumas espécies foi também observado por MERCIER e GUERREIRO FILHO (1990) e NARA e WEBER (2002) nas espécies de *Aechmea distichantha* Lem. e *Aechmea beeriana* L.B.Sm. & M.A. Spencer, respectivamente, as quais apresentaram 100% de germinação em faixa de temperaturas de 15 °C a 35 °C. PEREIRA et al. (2010) estudando o *Nidularium innocentii* Lem. verificaram que a espécie apresentou porcentagens de germinação acima de 75% na faixa de temperatura de 20 a 26 °C, temperatura essa, também utilizada nesse trabalho. A baixa porcentagem de germinação de algumas espécies pode ser devido à sua condição fisiológica e às baixas reservas nutricionais.

Baixas porcentagens de contaminação foram observadas entre as espécies, sendo que das 57, apenas 12,28 % obtiveram porcentagens de contaminação acima de 30% [BGB-620 (60%), BGB-083 (50%), BGB-016 (40%), BGB-676 (40%), BGB-420 (40%), BGB-858 (35%), BGB-394 (30%)] (Tabela 1).

A contaminação na cultura de tecidos é um dos entraves para o estabelecimento de espécies nas condições *in vitro*, inviabilizando o posterior processo de conservação (SOUZA et al., 2013). A contaminação observada no presente estudo foi basicamente fungica e, possivelmente, foi devido à ineficiência no processo de desinfestação para algumas espécies, necessitando assim, ajustes na forma de desinfestação das sementes. Os apêndices plumosos e alados, que servem como dispersores em condições naturais, apresentam reentrâncias (SILVA, 2018) e mesmo tendo sido removidos ao máximo, partes ainda ficam aderidas o que dificulta a remoção de fungos e bactérias.

Estudos com germinação de sementes de bromélias apresentaram resultados semelhantes à espécies estudadas no presente trabalho, demonstrando que de uma maneira geral não há maiores problemas para a desinfestação das sementes (GALVANESI et al., 2007; FIGUEIREDO, 2003; SANTOS, 2009). FORTES et al. (2004) relatam que no estabelecimento *in vitro*, a presença de fungos, apesar de causar danos, não é muito importante como a de bactérias, visto que, evitar sua ocorrência é uma questão de ajustar a assepsia no estabelecimento do material, enquanto que as ocorrências bacterianas, principalmente se forem de origem endofítica, implicam em um controle mais complexo, com o uso de outros agentes, como antibióticos no meio de cultura.

O início da germinação dos acessos ocorreu de forma irregular com uma variação de 4 a 61 dias após estabelecimento, com tempo médio entre as espécies de 16,8 dias. A espécie BGB-261 foi o mais precoce, germinando aos 4 dias e o mais tardio foi o BGB-420. (Tabela 1).

PEREIRA et al. (2010) estudando a espécie *Nidularium innocentii* (Lem.) relatam que o fato das sementes levarem 20 dias para germinar possivelmente pode está associado a algum mecanismo de dormência. Foi possível verificar que dentro de cada gênero há uma variação na porcentagem e início da germinação, não havendo a possibilidade de realizar uma correlação dessas variáveis com os gêneros.

**Tabela 1.** Estabelecimento *in vitro* de sementes de 57 acessos de Bromeliaceae pertencentes ao Banco de Germoplasma de Bromélias da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

BGB	Espécie	Sementes (n)	Contaminadas (%)	Germinadas (%)	Início Germinação (dias)
006	<i>Neoregelia camorimiana</i> Pereira & I.A.Penna	60	27	28	16
008	<i>Canistropsis seidelii</i> (L.B. Smith & Reitz) Leme	20	28	40	30
016	<i>Tillandsia stricta</i> Sol. ex Sims	50	40	42	15
030	<i>Aechmea blanchetiana</i> (Baker) L. B. Smith	50	8	22	46
034	<i>Hohenbergia blanchetii</i> (Baker) Mez	59	0	7*	29
036	<i>Tillandsia tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i> (Wawra) L.B.Sm.	60	0	0	-
073	<i>Hohenbergia castellanosii</i> L.B.Sm. & Read	60	0	97	5
083	<i>Dyckia leptostachya</i> Baker	22	50	36	13
132	<i>Hohenbergia stellata</i> Schult. & Schult.f.	31	6	87	13
157	<i>Vriesea fosteriana</i> L.B.Sm.	60	3	28	9
196	<i>Dyckia brevifolia</i> hor. ex Baker	60	8	37	21
197	<i>Billbergia nutans</i> H.Wendl.	60	3	95	10
198	<i>Dyckia secunda</i> L.B.Sm.	60	0	92	11
200	<i>Dyckia beatae</i> E.Gross & Rauh	60	10	45	21
201	<i>Dyckia fosteriana</i> L.B.Sm.	60	18	67	15
202	<i>Dyckia monticola</i> L.B.Sm. & Reitz	60	10	85	14
203	<i>Dyckia bracteata</i> Mez	60	0	88	11
208	<i>Dyckia paucispina</i> Leme & Esteves	60	0	75	15
210	<i>Dyckia formosensis</i> Leme & Z.J.G.Miranda	60	0	70	16
214	<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker	60	0	92	5
217	<i>Tillandsia pohliana</i> Mez	60	0	100	6

Continua...

Continuação Tabela 1...

BGB	Espécie	Sementes (n)	Contaminadas (%)	Germinadas (%)	Início Germinação (dias)
230	<i>Vriesea procera</i> Wittm.	60	0	0	-
248	<i>Aechmea multiflora</i> L.B.Sm.	60	0	77	38
261	<i>Tillandsia polystachia</i> (L.) L.	60	0	95	4
284	<i>Araeococcus</i> sp.	60	0	95	8
292	<i>Tillandsia heubergeri</i> Ehlers.	60	0	72	6
318	<i>Billbergia</i> sp.	60	5	90	8
351	<i>Acanthostachys strobilacea</i> Link, Klotzsch, & Otto	60	0	96	8
363	<i>Nidularium procerum</i> Lindm.	60	0	85	12
374	<i>Vriesea drepanocarpa</i> Mez	58	0	0	-
383	<i>Vriesea scalaris</i> É. Morren	60	6	98	7
391	<i>Neoregelia laevis</i> L.B.Sm.	60	27	50	41
394	<i>Neoregelia odorata</i> Leme	60	30	40	10
418	<i>Billbergia zebrina</i> Lindl. var. Alba	60	0	100	12
420	<i>Sincoraea burle-marxii</i> (L.B.Sm. & Read) Louzada & Wand.	60	40	48	61
460	<i>Vriesea minuta</i> Leme	39	2	0	-
463	<i>Aechmea mertensii</i> (Meyer) Schult. & Schult.f.	30	0	86	8
471	<i>Hohenbergia</i> Schult. & Schult.f.	60	23	62	40
500	<i>Araeococcus</i> sp.	60	3	28	16
522	<i>Orthophytum rubrum</i> L.B.Sm.	60	0	95	48
528	<i>Billbergia</i> sp.	60	0	89	10
556	<i>Hohenbergia igatuensis</i> Leme	60	0	43	18
557	<i>Hohenbergia penna</i> Pereira	60	8	97	9
566	<i>Sincoraea</i> sp.	60	0	0	-
620	<i>Vriesea</i> sp.	60	60	40	12

Continua...

Continuação Tabela 1...

BGB	Espécie	Sementes (n)	Contaminadas (%)	Germinadas (%)	Início Germinação (dias)
623	<i>Mezobromelia</i> sp.	60	0	7*	18
642	<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> L.B.Sm.	60	0	78	20
668	<i>Tillandsia loliacea</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	60	20	90	10
669	<i>Tillandsia juncea</i> (Ruiz & Pav.) Poir.	60	15	75	10
676	<i>Dyckia ferox</i> Mez	60	40	50	21
706	<i>Catopsis berteroniana</i> (Schult.f.) Mez	40	7	0	-
730	<i>Catopsis sessiliflora</i> (Ruiz & Pav.) Mez	14	0	0	-
794	<i>Hohenbergia salzmannii</i> (Baker) E.Morren ex Mez	60	0	55	9
855	<i>Aechmea aquilega</i> (Salisb.) Griseb.	60	0	80	12
856	<i>Hohenbergia catingae</i> Ule	60	0	92	18
857	<i>Hohenbergia augusta</i> (Vell.) E.Morren	60	0	85	15
858	<i>Pitcairnia</i> sp.	60	35	55	10

\* Plantas muito pequenas impossibilitando os ensaios de conservação.

### 3.2 Conservação *in vitro*

Após a germinação das sementes e a emergência das plântulas, foi possível o estabelecimento do ensaio de 48 espécies de bromélias (Tabela 2, Figuras 2-4). Das 57 espécies do ensaio de germinação, sete não apresentaram nenhuma germinação e duas apresentaram um número reduzido de plântulas, inviabilizando assim a utilização dessas espécies nos ensaios de conservação *in vitro*.

A análise de variância demonstrou uma interação significativa entre os três fatores estudados e de forma isolada apenas para os fatores de temperatura do ambiente de cultivo e espécies, para todas quatro variáveis (Tabela 2). Todas as plantas formadas apresentaram um desenvolvimento morfológico normal, não sendo verificada a emissão de brotações laterais ao final dos seis meses de avaliação (Figura 4).

De forma geral, a conservação das plantas em temperatura de  $19 \pm 1$  °C reduziu o desenvolvimento da planta, independente da concentração de sais MS, apresentando diferença significativa na altura de plantas, número de folhas verdes, número de folhas senescentes e número de raízes aos seis meses de cultivo *in vitro* (Figura 2). Esse resultado é interessante quando se pensa em conservação por crescimento lento. A redução do metabolismo das plantas diminui de forma significativa o trabalho de manutenção do banco de germoplasma, pela redução no número de subcutivos e conseqüentemente pode contribuir para evitar a ocorrência de variações somaclonais.

Os valores de altura e número de raízes nas plantas cultivadas em ambiente com temperatura de  $19 \pm 1$  °C foram 50% menores quando comparados com as plantas mantidas em ambiente com temperatura de  $26 \pm 1$  °C (Figura 2). No que concerne a concentração de sais de MS não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das quatro variáveis, independente da temperatura (Figura 2).

Avaliando as espécies independente da temperatura de conservação e concentração de sais MS, pode-se observar que as espécies de *Billbergia*, *Aechmea* e *Hohenbergia* apresentaram as maiores alturas, com destaque principalmente para, BGB-318 e BGB-528 (Figuras 3 e 4A). As menores alturas de plantas foram observadas nos gêneros *Tillandsia*, *Vriesea* e *Dyckia* (Figuras 3 e 4A). Esses resultados estão de acordo com o desenvolvimento da plantas em ambiente natural. Plantas de *Tillandsia* e *Vriesea* estudadas no presente trabalho são pequenas em torno de 10 a 25 cm de altura o que pode ter influenciado nesses resultados.

O maior número de folhas verdes foram observados nas espécies de *Tillandsia*, com destaque para BGB-016, BGB292, BGB-261, BGB-668 e na espécie BGB-318. O maior número de folhas senescentes foi observado na espécie BGB-668. Os menores registro para folhas senescentes foram BGB-006, BGB-008, BGB-030, BGB-083, BGB-132, BGB-214, BGB-248, BGB-351, BGB-391, BGB-857. É importante se avaliar o conjunto de variáveis antes de se decidir pelo melhor tratamento, e não apenas com base no tamanho das plantas. Uma das variáveis mais determinantes na conservação *in vitro* é o número de folhas senescentes, um importante indicador de um estágio fisiológico mais avançado e que pode determinar o momento do subcultivo (SILVA, 2018).

**Tabela 2.** Altura da planta, número de folhas verdes, número de folhas senescentes e número de raízes de plantas de 58 espécies de Bromeliaceae conservadas *in vitro* durante seis meses em função das concentrações de sais de MS/2 e temperaturas.

Variáveis		ALT		NFV		NFS		NRA	
		19	26	19	26	19	26	19	26
006	MS/2	3,87aB	6,20bA	7,75aA	11,00aA	0,25aA	1,00aA	2,50aB	7,00aA
	MS	4,62aB	8,12aA	7,50aA	8,75aA	0,00aA	1,00aA	2,50aA	3,50bA
008	MS/2	3,75aB	8,00aA	6,20aA	8,00aA	0,00aB	2,00aA	2,50aB	7,00aA
	MS	4,50aA	6,25aA	6,00aA	8,00aA	0,00aA	0,50aA	3,00aA	3,50bA
016	MS/2	1,80aA	3,30aA	23,80aB	28,00bA	0,00aB	3,20aA	0,40aA	0,20aA
	MS	1,40aB	3,42aA	21,60aB	35,17aA	0,60aB	3,33aA	0,00aA	0,33aA
030	MS/2	4,17aB	9,50aA	9,00aA	9,33aA	0,00aA	1,67aA	2,67aA	5,33aA
	MS	2,67aB	5,75bA	8,00aA	10,00aA	0,00aA	0,00aA	2,67aA	2,50aA
073	MS/2	4,13aB	11,87aA	6,80aA	8,33aA	0,53aB	2,13aA	1,60aA	2,53aA
	MS	4,43aB	10,43bA	7,93aA	9,40aA	0,93aA	1,13bA	1,60aA	1,53aA
083	MS/2	1,00aA	2,75aA	5,00aA	8,50aA	1,00aA	0,00aA	2,00aA	3,50aA
	MS	1,00aB	4,00aA	3,00aB	8,00aA	1,00aA	0,00aA	0,00bB	2,50aA
132	MS/2	5,50aB	8,25aA	8,75aA	9,00aA	0,17aA	1,25aA	2,33aA	3,75aA
	MS	3,90aB	7,42aA	5,60bA	7,17aA	0,60aA	0,67aA	2,60aA	1,83aA
157	MS/2	1,67aA	2,25aA	15,50aA	14,50aA	7,00aA	4,33aA	0,00aA	0,00aA
	MS	1,30aA	2,06aA	9,60bB	13,25aA	5,00aA	3,50aA	0,00aA	0,00aA
196	MS/2	1,80aA	2,97aA	7,80aB	12,83aA	5,20aA	3,00aA	2,00aB	3,50aA
	MS	1,50aB	3,50aA	8,60aB	12,67aA	4,00aA	4,17aA	2,20aA	2,50aA
197	MS/2	4,89bB	7,11aA	11,44aA	11,22aA	1,56aA	2,67aA	2,44aA	3,67aA
	MS	6,78aA	7,00aA	14,33aA	13,87aA	1,11aA	3,50aA	2,89aA	4,00aA
198	MS/2	2,62aB	6,67aA	7,25aA	8,33aA	1,00aA	3,33aA	2,75aA	3,33aA
	MS	1,75aB	5,50aA	6,50aA	8,00aA	2,50aA	1,75aA	2,00aA	2,75aA
200	MS/2	2,20aB	4,33aA	8,00aA	9,67aA	2,20aA	1,33aA	2,40aA	2,33aA
	MS	2,50aB	5,62aA	11,00aA	8,00aA	2,00aA	1,75aA	1,67aA	3,00aA
201	MS/2	2,83aA	3,50aA	8,33aA	12,50aA	3,83aA	2,00bA	1,67aA	1,00aA
	MS	3,17aA	5,10aA	8,33aA	8,40aA	2,00aB	5,00aA	1,67aA	1,80aA
202	MS/2	2,92aB	5,57aA	7,33aA	9,33aA	3,00aA	3,50aA	2,08aB	4,00aA
	MS	1,79aB	4,18bA	6,58aA	8,36aA	3,08aA	1,54aA	2,08aB	3,82aA
203	MS/2	1,50aB	3,96aA	7,80bA	7,20bA	2,60aA	2,20aA	1,20aA	1,00aA
	MS	1,50aB	4,21aA	9,00aA	11,28aA	0,00aB	2,43aA	1,50aA	2,28aA
208	MS/2	2,08aB	5,00aA	9,33aA	8,00aA	2,50aB	4,17aA	2,67aA	2,83aA



	MS	2,87aA	3,95aA	3,75bB	7,60aA	3,12aA	3,20bA	1,00aA	2,00aA
210	MS/2	2,30aA	2,75bA	10,20aA	7,25aB	4,00aA	2,00aA	0,20aA	1,50aA
	MS	1,67aB	4,37aA	9,00aA	8,00aA	2,67aA	2,00aA	3,33aA	3,00aA
214	MS/2	4,81aB	9,04aA	8,44aA	9,29aA	0,11aA	0,37aA	2,33aB	4,54aA
	MS	4,88aB	9,39aA	8,31aA	8,75aA	0,23aA	0,21aA	3,00aB	4,17aA
217	MS/2	1,00aA	1,64aA	6,00aB	10,57aA	0,75bA	2,00aA	0,25aA	0,43aA
	MS	1,06aA	1,43aA	8,25aB	14,28aA	2,62aA	1,71aA	0,12aA	0,00aA
248	MS/2	2,21aB	6,19aA	5,14aB	8,00aA	0,57aA	0,38aA	2,71aB	5,08aA
	MS	2,42aB	5,77aA	6,08aB	8,23aA	0,50aA	0,85aA	2,75aA	3,92aA
261	MS/2	1,55aA	1,78aA	12,11aB	20,78aA	0,55aA	1,78aA	0,00aB	2,11aA
	MS	1,45aA	2,15aA	12,36aB	23,50aA	0,27aA	0,90aA	0,91aA	1,70aA
284	MS/2	4,93aB	7,37aA	8,25aA	9,50aA	3,25aA	2,75aA	2,12aA	3,37aA
	MS	4,07aB	6,12aA	10,28aA	9,25aA	2,14aA	1,75aA	3,28aA	2,50aA
292	MS/2	1,63aA	2,48aA	20,00aA	22,27aA	1,27aA	1,47aA	0,00aB	0,33aA
	MS	1,33aB	2,73aA	22,33aA	25,00aA	1,00aA	1,87aA	0,67aA	0,60aA
318	MS/2	8,00aB	11,77aA	12,18bB	17,08aA	1,91aA	1,54aA	2,91aB	11,38aA
	MS	8,39aB	11,84aA	16,33aA	18,31aA	0,67aA	0,69aA	3,55aB	11,38aA
351	MS/2	5,06aB	11,25aA	5,75aB	8,87aA	1,25aA	0,00aA	1,00aB	3,87aA
	MS	5,94aB	8,43bA	6,87aB	10,57aA	0,62aA	0,57aA	1,50aB	4,57aA
363	MS/2	4,85aB	6,42aA	7,93aB	10,08aA	0,78aA	1,85aA	2,14aB	3,23aA
	MS	5,35aB	7,23aA	8,23aA	9,69aA	0,15aA	1,38aA	2,08aB	3,15aA
383	MS/2	1,00aA	2,58aA	8,00aA	6,92bA	7,00aA	1,42aB	0,00aB	1,17aA
	MS	1,00aA	2,58aA	6,00aB	10,58aA	4,00bA	1,08aB	0,00aB	1,08aA
391	MS/2	3,00aA	4,10aA	7,50aA	9,20aA	0,00aA	0,60aA	2,33aB	3,40aA
	MS	2,33aB	5,40aA	7,33aA	9,00aA	0,66aA	0,20aA	2,00aB	4,20aA
394	MS/2	2,41aB	6,37aA	17,54aA	12,17bB	2,00aA	0,67aA	3,09aB	5,50aA
	MS	2,41aB	6,95aA	18,09aA	16,64aA	1,91aA	0,82aA	2,18aB	5,54aA
418	MS/2	5,50aB	8,33aA	12,33aA	11,00bA	2,67aA	3,67aA	5,57aA	6,00bA
	MS	6,33aA	8,00aA	14,00aA	15,00aA	1,67aA	0,00aB	3,33bB	9,00aA
420	MS/2	4,45aB	9,38aA	8,50aA	10,38aA	3,50aA	2,92aA	4,70aA	5,92aA
	MS	2,95aB	9,87aA	9,09aA	10,50aA	2,63aA	2,25aA	4,00aB	6,08aA
463	MS/2	2,40aB	6,42aA	6,80aA	6,83aA	5,00aA	4,83aA	0,40aB	4,67aA
	MS	1,50aB	6,83aA	5,75aB	8,83aA	3,75bA	2,67bA	0,00aB	3,33aA
471	MS/2	2,37aB	5,00aA	6,75aA	9,57aA	0,75aA	0,57aA	2,25aB	4,00aA
	MS	2,18aB	4,85aA	6,50aB	10,00aA	1,87aA	0,60aA	2,12aA	3,90aA
500	MS/2	3,80aA	4,75aA	10,30aA	12,25aA	1,20aA	1,25aA	3,90aB	6,25aA
	MS	3,22aA	4,00aA	8,89aB	13,00aA	1,89aA	0,75aA	3,44aA	4,25aA
522	MS/2	2,32aB	7,45aA	8,82aB	11,10aA	3,09aA	3,60aA	4,63aB	10,00aA
	MS	2,60aB	7,87aA	9,50aB	12,75aA	3,20aA	5,25aA	4,10aB	9,00aA
528	MS/2	6,75aB	8,67bA	11,17aA	12,92aA	2,92aA	3,92aA	2,33aB	6,42aA
	MS	5,92aB	9,86aA	10,92aA	13,54aA	2,58aA	2,91aA	2,08aB	4,36aA
556	MS/2	4,00aB	6,21aA	7,57aA	9,14aA	0,85aA	1,00aA	1,57aB	4,14aA
	MS	4,75aB	6,67aA	8,00aA	8,66aA	1,25aA	0,89aA	1,25aA	1,89bA
557	MS/2	4,50aB	8,14bA	7,00aA	6,92aA	0,90aB	2,29aA	2,52aB	4,08aA
	MS	4,63aB	9,98aA	7,69aA	8,54aA	0,56aA	1,37aA	2,21aA	3,54aA
620	MS/2	1,25aA	1,50aA	7,80aB	11,00aA	0,20aA	1,37aA	0,80aA	1,12aA
	MS	1,18aA	1,32aA	7,19aB	11,00aA	0,81aA	1,87aA	0,36aB	1,25aA
642	MS/2	2,11aA	2,50aA	6,00aA	6,43aA	1,11aA	1,42aA	1,00aB	2,85aA
	MS	2,00aA	2,50aA	5,33aA	6,87aA	1,83aA	1,62aA	0,67aB	2,37aA
668	MS/2	1,00aA	2,00aA	24,25aA	16,00aB	9,25aA	4,67aA	0,00aA	0,00aA
	MS	1,00aA	2,00aA	21,25aA	14,00aA	6,25bA	4,00aA	0,00aA	0,00aA
669	MS/2	1,00aA	1,50aA	11,40aA	10,33aA	1,00aA	1,67aA	1,00aA	1,00aA
	MS	0,80aA	1,58aA	7,20bB	11,00aA	1,40aA	1,67aA	0,40aA	1,17aA
676	MS/2	4,08aA	5,32aA	8,33aA	10,12aA	1,67aA	2,47aA	4,17aA	4,70aA
	MS	3,50aA	4,61aA	8,17aA	10,06aA	1,50aA	0,89aA	4,00aA	5,33aA
794	MS/2	3,00aB	9,12aA	9,25aA	9,00aA	2,00bA	1,25aA	5,00aA	6,75aA
	MS	3,17aB	9,67aA	10,00aA	9,67aA	4,00aA	2,00aA	3,67bB	8,33aA
855	MS/2	3,94aB	8,19aA	10,55aA	11,00aA	0,11aB	2,69aA	2,56aA	3,77aA
	MS	3,92aB	7,80aA	11,75aA	11,20aA	0,50aA	0,60bA	2,52aA	2,60aA

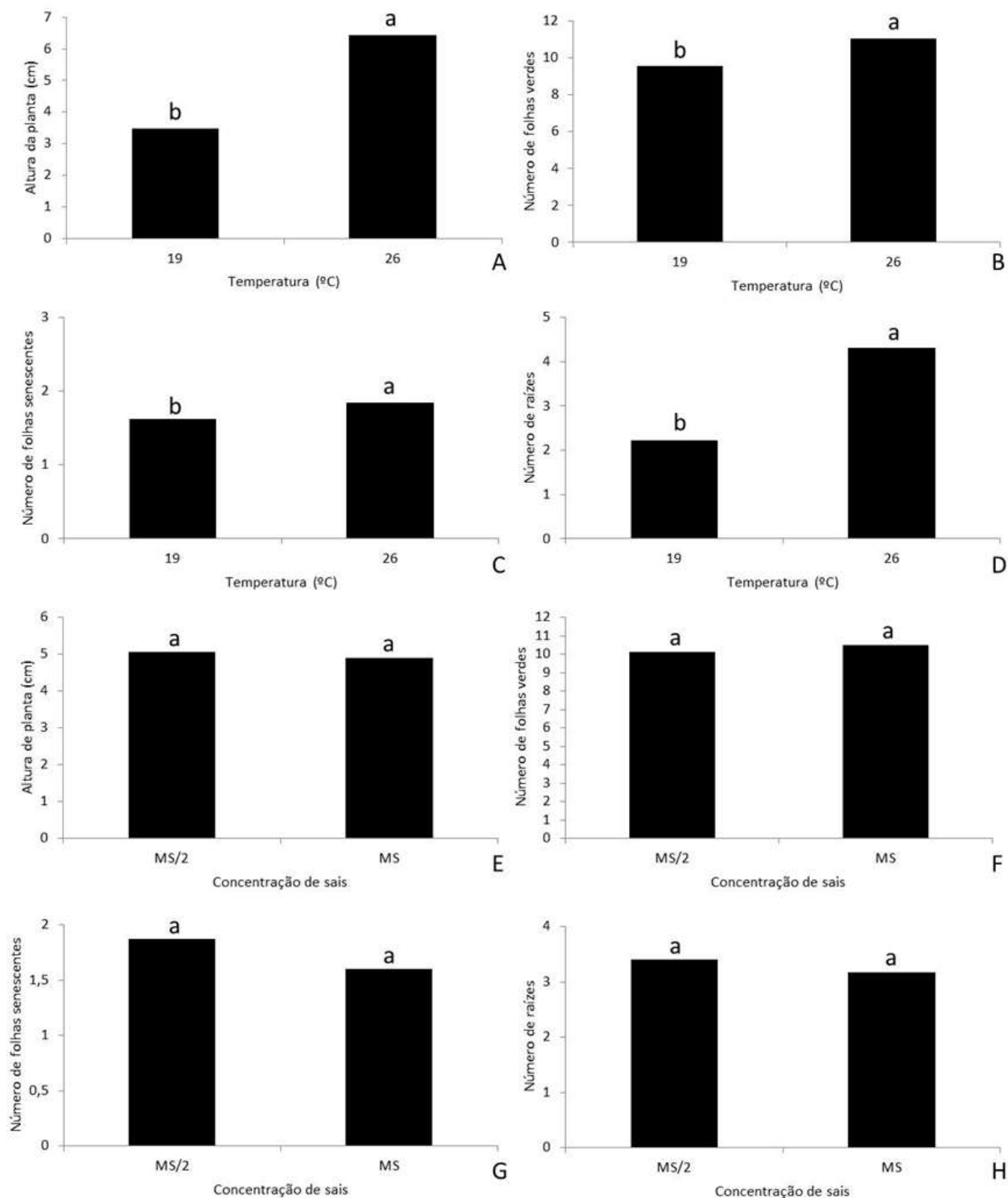
856	MS/2	4,75aB	7,62aA	8,50aA	7,75aA	1,50aA	1,25aA	3,00aA	4,75aA
	MS	4,25aB	7,20aA	7,00aA	8,00aA	0,83aB	2,40aA	2,83aA	2,80bA
857	MS/2	3,21aB	6,00aA	7,50aA	7,67aA	0,25aA	1,11aA	3,08aB	5,11aA
	MS	2,87aB	5,79aA	7,00aA	8,25aA	0,25aA	0,17aA	2,37aB	3,50aA
858	MS/2	4,55aB	12,42aA	8,60aA	6,77bA	1,80bB	4,38aA	4,30aB	18,69bA
	MS	3,35aB	12,50aA	7,31aA	9,12aA	4,23aA	5,12aA	4,92aB	34,25aA
CV (%)		28,89		15,74		24,37		32,75	

*Médias seguidas por letras diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas na coluna dentro de cada variável e acesso analisado, não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste F.*

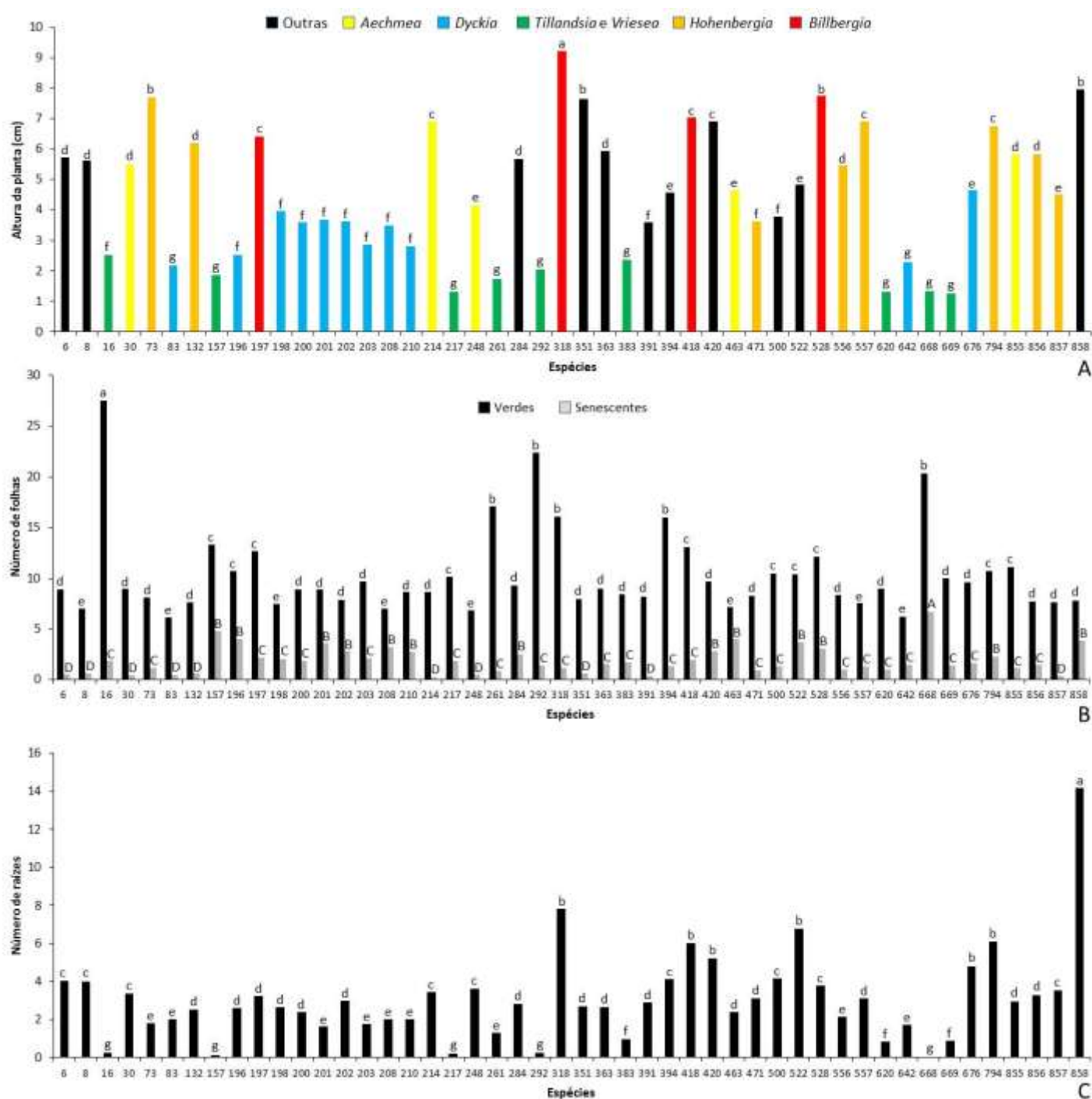
No caso deste trabalho, não houve uma relação direta da altura de planta com o número de folhas senescentes, o que deixa evidente, que apesar do maior crescimento observado em algumas espécies não houve comprometimento ou envelhecimento da planta conservada. Esse é um aspecto que precisa ser observado levando em consideração o resgate e a regeneração da planta conservada *in vitro*. Quanto maior o vigor da planta, mais segura será a sua regeneração.

Em relação ao número de raízes, a espécie BGB-858 se destacou das demais com o dobro de raízes em relação à segunda maior BGB-318 (Figuras 3 e 4C). As espécies BGB-016, BGB-157, BGB-217, BGB-292 e BGB-668 apresentaram um número insignificante ou não apresentaram raízes. Todas essas espécies são da subfamília Tillandsioideae e possuem raízes apenas para fixação, uma vez que são plantas epífitas. As raízes *in vitro* nem sempre são funcionais quando entram na condição *ex vitro*, demandando, algumas vezes a redução/ corte para que possam ser renovadas no período de aclimatização (SOUZA et al., 2013). A etapa de aclimatização é delicada e demanda muitos cuidados, já que é um processo gradual de adaptação da planta a uma condição ambiental diferente em que a planta passa de uma condição heterotrófica para a autotrófica. Aliado a isso, estruturas envolvidas na proteção da planta contra a perda de água, ainda não estão completamente desenvolvidas, como as cutinas e serinas.

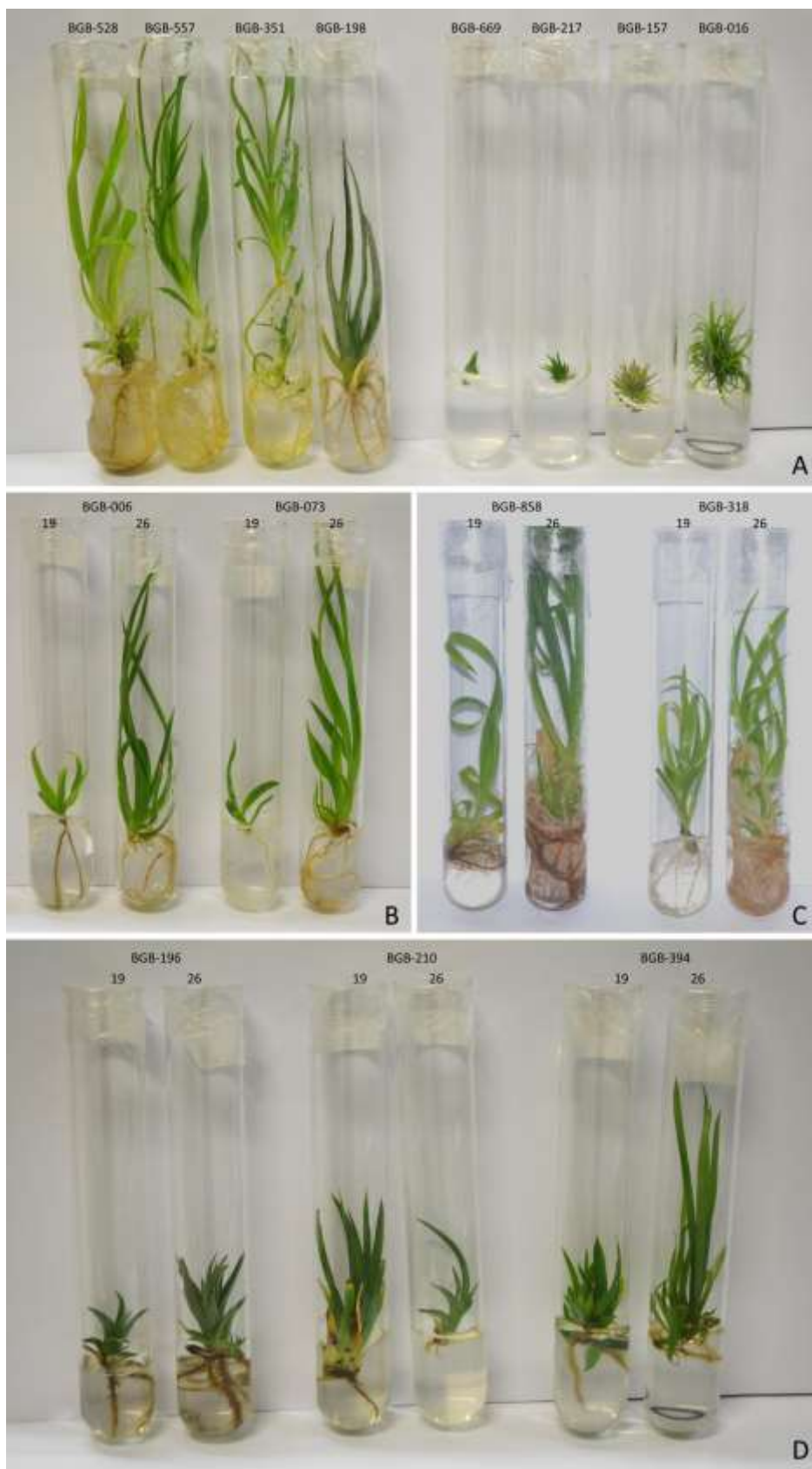
Uma das diferenças mais marcantes entre ambas as condições de incubação usadas no presente trabalho foi a temperatura, com uma diferença de 6 °C de uma sala para outra. Temperaturas mais elevadas podem induzir a um aumento, no metabolismo da planta e consequentemente na altura e no número de folhas e raízes (ISLAM et al., 2005; SILVA, 2018). Esses autores estudando abacaxizeiros e três espécies de *Aechmea* relataram que o aumento de temperatura acelerou o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*.



**Figura 2.** Altura da planta (A-E), número de folhas verdes (B-F), número de folhas senescentes (C-G) e número de raízes (D-H) de plantas de 48 espécies de Bromeliaceae conservadas *in vitro* durante seis meses em concentrações de sais MS dos ambientes de cultivo. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas dentro da mesma variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F.



**Figura 3.** Altura da planta (A), número de folhas verdes e senescentes (B) e número de raízes (C) de plantas de 48 espécies de Bromeliaceae conservadas *in vitro* durante seis meses, independente das concentrações de sais de MS e temperaturas dos ambientes de cultivos. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas dentro da mesma variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.



**Figura 4.** Plantas de diferentes espécies de Bromeliaceae conservadas *in vitro* por seis meses. A) Espécies da subfamília Bromelioideae evidenciando maior altura de planta (BGB-528 = *Billbergia* sp., BGB-557 = *Hohenbergia penna*, BGB-351 = *Acanthostachys strobilacea* e BGB-198 = *Dyckia secunda*) e menor altura de planta na subfamília Tillandsioideae (BGB-669 = *Tillandsia juncea*, BGB-217 = *T.*

*pohliana*, BGB-157 = *Vriesea fosteriana* e BGB-016 = *T. stricta*). B-D) Influencia da temperatura na altura da planta (B), número de raízes (C) e número de folhas (D) nas espécies BGB-006 = *Neoregelia camorimiana*, BGB-073 = *H. castellanosii*, BGB-858 = *Pitcairnia* sp., BGB-318 = *Billbergia* sp., BGB-196 = *D. brevifolia*, BGB-210 = *D. formosensis* e BGB-394 = *N. odorata* independente da concentração de sais de MS.

Pode-se observar que 37 espécies apresentaram altura de planta superior na temperatura de  $26 \pm 1$  °C e 11 espécies não apresentaram diferenças entre as temperaturas. Em relação à concentração de sais de MS foi possível observar que as espécies apresentaram plasticidade, algumas com maior altura com a composição completa de sais (BGB-006, BGB-197, BGB-210, BGB-528, BGB-557) e outras com a metade da concentração de sais (BGB-030, BGB-073, BGB-202 e BGB-351) (Tabela 2).

O número de folhas verdes foi superior na temperatura de  $26 \pm 1$  °C em 31,58 % das espécies independente da concentração de sais MS. Apenas três espécies (BGB-210, BGB-394, BGB-668) quando cultivadas com a metade da concentração de sais MS e temperatura de  $19 \pm 1$  °C apresentaram um comportamento superior (Tabela 2)

O maior número de folhas senescentes foi observado na temperatura de  $26 \pm 1$  °C para as espécies BGB-008, BGB-016, BGB-073, BGB-201, BGB-203, BGB-208, BGB-557, BGB-855, BGB-856, BGB-858, independente da concentração de sais de MS. Apenas as espécies BGB-383, BGB-418 apresentaram maior número de folhas senescentes na temperatura de  $19 \pm 1$  °C. O maior número de folhas senescentes foi observado na espécie BGB-668 na temperatura de  $19 \pm 1$  °C e na metade da concentração de sais MS (Tabela 2)

Em relação ao número de raízes 19 espécies não apresentaram diferenças significativas entre as temperaturas e as demais 29 espécies foram influenciadas positivamente com temperatura de  $26 \pm 1$  °C. Mais uma vez, pode-se observar que a concentração de sais de MS influenciou de forma pontual em algumas espécies. As espécie BGB-668 e BGB-157 não apresentaram enraizamento independente da temperatura e concentração de sais MS, já as espécies BGB-016, BGB-083, BGB-261, BGB-292, BGB-383 e BGB-463 não apresentaram raízes, mas em algumas espécies apresentaram quando mantidas em sala de conservação à uma temperatura de  $19 \pm 1$  °C em função da concentração de sais (Tabela 2).

A temperatura tem sido considerada como um dos principais fatores responsáveis, tanto para a germinação de sementes, quanto para a conservação de espécies, por afetar especialmente, a velocidade de absorção de água e a reativação das

reações metabólicas, fundamentais aos processos de mobilização de reservas e crescimento das plantas (COELHO et al., 2011).

Apesar da existência de metodologias para a conservação *in vitro* de bromélias, a dependência genotípica da espécie, demanda estudos na direção de protocolos que possam ser eficientes para um maior número de espécies facilitando a gestão e favorecendo maior estabilidade genética do que está sendo conservado.

Alguns aspectos devem ser considerados na conservação *in vitro*, como o resgate do material que está conservado, ou seja, a capacidade da planta manter-se viável após o período de conservação. Muitas vezes a estratégia utilizada para a redução do metabolismo da planta por crescimento lento pode causar danos irreversíveis, dificultando a recuperação das mesmas para a condição *ex vitro* (HASSAN; BEKHEET, 2008; GOPAL; CHAUHAN, 2010; OREGO et al., 2012). No entanto, em bromeliáceas os ensaios de conservação conduzidos durante seis meses apresentaram resultados promissores, demonstrando que a estratégia de crescimento lento é eficiente na conservação deste germoplasma nas condições testadas.

#### 4. CONCLUSÕES

A concentração de sais MS não influenciou diretamente no desenvolvimento das plantas conservadas.

A temperatura da sala de conservação ( $19 \pm 1$  °C) favoreceu a condição de crescimento mínimo das plantas conservadas nessa condição de incubação, impactando na altura das plantas e no número de raízes.

Foi possível conservar 47 espécies de bromélias por um período de seis meses sem a necessidade de subcultivo.

#### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. B. W.; SANTANA, G. S.; PINHEIRO, M. R.; COSTA, M. A. P. C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 296-300, 2002.

BALKE, M.; GOMEZ, J. Z.; RIBERA, I.; VILORIA, A.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; STEINER, M.; GARCIA, L.; HENDRICH, A. P. Ancient associations of aquatic beetles and tank bromeliads in the neotropical forest canopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. p. 6356-6361. 2008.

BENZING, D. H. Bromeliaceae: Profile and adaptive radiation. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2000, 690p.

CARVALHO, C. P.; HAYASHI, A. H.; BRAGA, M. R.; NIEVOLA, C. C. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. **Plant Physiology and Biochemistry**. p. 71, p. 144-154. 2013.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006, 28p.



COELHO, M. F. B.; VIEIRA, S. N.; CHIG, L. A.; SANTOS, L. W.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Superação da dormência em sementes de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 472-476, 2011.

DAL VESCO, L. L. D.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p. 515-522. 2011.

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

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant**, v. 45, p. 5-16. 2011.

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

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

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JUNIOR, A. A.; COELHO, M. A. N.; COSTA, A. F.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M. G.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. M.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. C. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, v. 62, p. 39-45, 2012.

FORZZA, R. C.; COSTA, A. F.; LEME, E. M. C.; VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L.; LOUZADA, R. B.; MONTEIRO, R. F.; JUDICE, D. M.; FERNANDEZ, E.

P.; BORGES, R. A. X.; PENEDO, T. S. A.; MONTEIRO, N. P.; MORAES, M. A. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson & Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pp. 315-397, 2013.

FREITAS, C.; CARVALHO, V.; NIEVOLA, C. C. Effect of sucrose concentrations on *in vitro* growth and subsequent acclimatization of the native bromeliad *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra. **Biotemas**, n. 28, p. 37-42, 2015.

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

GOPAL, J.; CHAUHAN, N.S., Slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm at low temperature. **Potato Research**, v. 53, n.3, p141–149.2010.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D., GOUDA, K. **Encyclopaedia of Bromeliads Version 4**. Disponível em: <<http://bromeliad.nl/encyclopedia/>>. Acesso em: 1 Julho 2019.

HASSAN, N. A., BEKHEET, S.A. Mid-term storage and genetic stability of strawberry tissue cultures. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 505-511.2008.

ISLAM, M. T.; DEMBELE, D. P.; KELLER, J. E. R. Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 123– 130, 2005.

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

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

MERCIER, H.; GUERREIRO FILHO, O. Propagação sexuada de algumas espécies de bromélias nativas da Mata Atlântica. **Hoehnea**, v. 17, n. 2, p. 19-26, 1990.

MOLLO, L.; MARTINS, M. C. M.; OLIVEIRA, V. F.; NIEVOLA, C. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, p. 107, p. 141-149, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. M. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NARA, A. K.; WEBBER, A. C. Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixio na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 4, p. 571-88, 2002.

OREGO, K.O.; GITONGA, N.M. MWANGI, M. OMBORI, O. NGUGI, M. Costeffective nutrient sources for tissue culture of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 66, p. 1296412973. 2012.

PEREIRA, A. R.; PERERIRA, T. S.; ANDRADE, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1150- 1162, 2008.

PEREIRA, C.; CUQUEL, F. L.; PANOBIANCO, M. Germinação e armazenamento de sementes de *Nidularium innocentii* (Lem.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2 p. 36-41, 2010.

REED, B. M.; GUPTA, S.; UCHENDU, E. E. *In vitro* genebanks for preserving tropical biodiversity. NORMAH, M.N.; CHIN, H.F.; REED, B.M. (Org.) **Conservation of tropical plant species**. Springer: New York. p. 77106. 2013.

REITZ, R. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. **Flora Ilustrada Catarinense**, v. 1, p. 1-518, 1983.

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 em la**

**agricultura:** fundamentos y aplicaciones. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p. 697-714. 1991.

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

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

SILVA, S. S. S. **Multiplicação *in vitro* e conservação de espécies endêmicas e vulneráveis de bromeliáceas.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, BA, 90p. 2018.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A.; MENEZES, M. C.; SILVEIRA, D. G., SANTOS, V. S. Micropropagação da mandioca. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas.** 2 ed. Embrapa: Brasília, p. 345-371, 2013.

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

WANDERLEY, M.; MARTINS, S. Bromeliaceae. In: WANDERLEY, M.; SHEPHERD, G.; GIULIETTI, A. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo.** Instituto de Botânica, São Paulo. v. 5, pp. 494, 2007.