

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE BROMELIÁCEAS**

**MARIA JOSIRENE SOUZA MOREIRA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**MARÇO – 2008**

# **CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE BROMELIÁCEAS**

**Maria Josirene Souza Moreira**

Engenheira Agrônoma  
Universidade Federal da Bahia, 2006.

Dissertação submetida à Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de concentração: Fitotecnia.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Pereira 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 - 2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

M838

Moreira, Maria Josirene Souza  
Conservação *in vitro* de bromeliáceas / Maria Josirene Souza  
Moreira. - Cruz das Almas, BA, 2008.  
61f.: il..

Orientador: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do  
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,  
Ambientais e Biológicas, 2008.

1. Bromeliaceae – germinação 2. Bromeliaceae –  
conservação I. Universidade Federal do Recôncavo da  
Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e  
Biológicas. II. Título

CDD 20ed. 635.9

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB  
(Orientadora)

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

---

Dr<sup>a</sup>. Tatiana Góes Junghans  
EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Agrárias em.....  
Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em.....

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	7
Capítulo 1	24
GERMINAÇÃO DE SEMENTES <i>IN VITRO</i> DE ESPÉCIES DE BROMÉLIA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO.....	
Capítulo 2	40
CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Aechmea fasciata</i> e <i>Aechmea miniata</i> .....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	

## CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE BROMELIÁCEAS

Autora: Maria Josirene Souza Moreira

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**Resumo:** As bromélias são plantas típicas das zonas tropicais a subtropicais das Américas. A grande concentração das espécies ocorre na América do Sul, estimando-se que 40% das espécies e 73% dos gêneros ocorram no Brasil. Das 160 espécies catalogadas, cerca de 76 estão vulneráveis a extinção, 33 em perigo, 48 criticamente em perigo e 3 foram extintas da natureza. Para atenuar esse problema é necessário pesquisar protocolos de conservação, a fim de que a exploração excessiva do germoplasma nacional não conduza a um cenário de erosão genética irreversível. O trabalho consiste em estudar o efeito do carvão ativado e ácido giberélico, na germinação *in vitro* de bromeliáceas, bem como estabelecer protocolo de conservação *in vitro* de *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*. Sementes de *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Aechmea burle-marxii*, *Aechmea* sp., *Vriesea* sp. e *Bromélia antiacantha* Bertoloni foram incubadas em meio MS semi-sólido, suplementado com 3% de sacarose, 0,0; 1,0 e 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  e carvão ativado nas concentrações 0,0 e 1,0  $\text{g L}^{-1}$ . O carvão ativado não influenciou na germinação das sementes e os genótipos apresentaram exigências próprias, sendo o meio de cultura com  $\text{GA}_3$  mais eficiente, para *Vriesea* sp. e *Aechmea* sp.. Quanto a conservação *in vitro* microplantas de *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, foram incubadas em meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS, suplementado com 87,64 mM, 43,82 mM e 21,85 mM de sacarose ou manitol. É possível conservar sob crescimento lento, plantas de *A. fasciata* e *A. miniata*, em meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS suplementado com 43,82 mM ou 21,85 mM de manitol e mantidas sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  e intensidade de fluxo de fótons de  $22 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . As concentrações e fontes de carbono utilizadas na conservação não inviabilizaram a capacidade responsivas da cultura. A concentração de 2,0  $\text{mg. L}^{-1}$  de BAP foi eficiente na taxa de multiplicação, independente das espécies.

**Palavras chave:** ornamental, osmoreguladores, reguladores vegetais, sementes

## **IN VITRO CONSERVATION OF BROMELIADS**

Author: Maria Josirene Souza Moreira

Adviser: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**Abstract:** The bromeliad healthy typical plants of the tropical zones the subtropical of America. The great concentration of the species happens in South America, being considered that 40% of the species and 73% of the goods happen in Brazil. Of the 160 classified species, about 76 they are vulnerable the extinction, 33 in danger, 48 critically in danger and 3 were extinguished of the nature. To lessen that problem it is necessary to research conservation protocols, so that the excessive exploration of the national germplasm doesn't lead it scenery of irreversible genetic erosion. The work consists of studying the effect of the activated coal and giberelic acid, in the germination *in vitro* bromeliads, as well as to establish protocol of conservation *in vitro* of *Aechmea fasciata* and *Aechmea miniata*. Seeds of *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Aechmea burle-marxii*, *Aechmea* sp., *Vriesea* sp. and *Bromelia antiacantha* Bertoloni, were incubated in middle MS semi-solid, supplemented with 3% of sucrose, 0,0; 1,0 and 10  $\mu\text{M}$  of  $\text{GA}_3$  and coal activated in the concentrations 0,0 and 1,0  $\text{g L}^{-1}$ . The activated coal didn't influence in the germination of the seeds and the species they presented own demands, being the middle of culture with more efficient  $\text{GA}_3$ , for *Vriesea* sp. and *Aechmea* sp.. As the conservation *in vitro* plants of *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, were incubated in middle of culture MS  $\frac{1}{2}$ , supplemented with 87,64 mM, 43,82 mM and 21,85 sucrose mM or manitol. It is possible to conserve under slow growth, plants of *A. fasciata* and *A. miniata*, in middle of culture  $\frac{1}{2}$  MS supplemented with 43,82 mM or 21,85 manitol mM and maintained under conditions of 16 hours, temperature of  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  and photon flux densites of  $22 \text{ mmol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . The concentrations and sources of carbon used in the conservation they didn't make unfeasible the capacity responsive of the culture. The concentration of 2,0 mg.  $\text{L}^{-1}$  of BAP was efficient in the multiplication rate, independent of the species.

**Key words:** ornamental, osmotic regulators, growth regulators, seeds

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o país mais rico em biodiversidade de todo o Planeta. Em seu território encontram-se 20% do conjunto de plantas, animais e microrganismos existentes na face da terra. Apenas em plantas superiores, o Brasil possui em torno de 21% das 267 mil espécies já classificadas no mundo, sendo que entre essas, 7% são endêmicas (DINIZ; FERREIRA, 2000). Entretanto, esta diversidade vem sendo ameaçada, seja pela destruição dos habitats naturais ou pela extração e comercialização de forma indiscriminada de plantas e animais.

A legislação brasileira proibiu pela portaria nº 122-P coletas de plantas silvestres para a comercialização. Contudo muitos exemplares extraídos da natureza, entre as quais se destacam famílias botânicas atrativas para ornamentação, como bromeliáceas, orquídeas e cactáceas, são encontrados para a venda (BARROSO et al., 2007). Segundo os mesmos autores, a extração de plantas para a comercialização configura atividade não sustentada, e é considerada uma das principais causas de extinção. Ziller (2001) relata que a introdução de plantas exóticas é considerada a segunda maior ameaça à conservação da biodiversidade mundial, perdendo apenas para a destruição de habitats pela exploração humana direta.

O bioma Mata Atlântica, com apenas 7,3% da sua área original, é o que apresenta maior número de espécies ameaçadas ou extintas, com 383 táxons, seguido pelo Cerrado (112), Marinho (92), Campos Sulinos (60), Amazônia (58), Caatinga (43) e Pantanal (30). Isso significa que, em conjunto, Mata Atlântica e Cerrado respondem por mais de 78% das espécies da lista, ou seja, 495 táxons. (BIODIVERSITAS, 2008).

A riqueza natural da Mata Atlântica é demonstrada por números que impressionam. Cerca de 55% das espécies arbóreas e 40% das não-arbóreas são endêmicas deste bioma, chegando a 70% no caso das bromélias (MATA ATLÂNTICA, 2008).

A lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, editada em 1992 (Portaria IBAMA 037-N), relaciona um total de 107 espécies. Em 2005,

esta foi revisada no Workshop “Revisão da Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção”, computando atualmente 825 espécies vulneráveis a extinção, 326 em perigo, 343 criticamente em perigo, e 11 já extintas. No que se refere as bromélias 76 espécies estão vulneráveis, 33 em perigo, 48 criticamente em perigo e 3 já extintas da natureza (*Cryptanthus fosterianus*, *Neoregelia binotti*, *Nidularium utriculosum*)( BIODIVERSITAS, 2008).

Para atenuar esse problema é necessário pesquisar 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.

## 1. Bromeliáceas

As bromélias são plantas típicas das zonas tropicais a subtropicais das Américas. A área de ocorrência natural estende-se desde os estados da Virgínia, Texas e Califórnia, nos EUA, até a Argentina (REITZ, 1983). A grande concentração das espécies ocorre na América do Sul, estimando-se que 40% das espécies e 73% dos gêneros ocorram no Brasil (LEME; MARIGO, 1993). A única exceção fica por conta da *Pitcairnia feliciana*, exclusiva do Golfo de Guiné, no oeste africano, provavelmente é um caso recente de dispersão (BENZING, 2000).

Costa e Fontoura citados por Rodrigues et al. (2004) afirmam que as bromélias são encontradas em diferentes condições ambientais em razão de sua facilidade de adaptação e especializações. No território brasileiro, as bromélias ocorrem principalmente na região leste, sendo 81,8% das espécies conhecidas localizadas na região da Floresta Atlântica.

A família Bromeliaceae está dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae Harms, Tiliandisiodeae Harms e Bromelioideae Reichenbach (Tabela 1). O número de gêneros divergem entre os autores. Smith e Downs (1974) na Flora Neotrópica apresentam 46 gêneros. Entretanto, a descrição de novas espécies e o crescente estudo da família, tem ampliado este número para 51, 50 e 56 (BRUMMETT, 1992; LEME; MERIGO, 1993; LEME, 1997).

Tabela 1. Subdivisões da família Bromeliaceae (LEME, 1997).

<b>FAMÍLIA BROMELIACEAE</b>	
<p><b>SUBFAMÍLIA: Pitcairnioideae</b></p> <p>TRIBO: Pitcairnieae</p> <p>GÊNERO <i>Ayensua</i> <i>Connelia</i> <i>Cottendorfia</i> <i>Fosterella</i> <i>Lindmania</i> <i>Navia</i> <i>Pepinia</i> <i>Pitcairnia</i> <i>Steyerbromelia</i></p> <p>TRIBO: Brochinieae</p> <p>GÊNERO <i>Brocchinea</i></p> <p>TRIBO: Puyeeae</p> <p>GÊNERO <i>Brewcaria</i> <i>Deuterocohnia</i> <i>Dyckia</i> <i>Encholirium</i> <i>Hechtia</i> <i>Puya</i></p> <p><b>SUBFAMÍLIA: Tiliandsioidae</b></p> <p>GÊNERO <i>Alcantarea</i> <i>Catopsis</i> <i>Glomeropitcairnia</i> <i>Guzmania</i> <i>Mezobromelia</i> <i>Tillandsia</i> <i>Vriesea</i> <i>Werauhia</i></p>	<p><b>SUBFAMÍLIA: Bromelioideae</b></p> <p>GÊNERO: <i>Acnhostachys</i> <i>Aechmea</i> <i>Ananas</i> <i>Androlepsis</i> <i>Araecoccus</i> <i>Bilbergia</i> <i>Bromelia</i> <i>Canistropsis</i> <i>Canistrum</i> <i>Cryptanthus</i> <i>Deinacanthon</i> <i>Disteganthus</i> <i>Edmondoa</i> <i>Fascicularia</i> <i>Femseea</i> <i>Greigia</i> <i>Hohenbergia</i> <i>Hohenbergiopsis</i> <i>Lymania</i> <i>Neoglaziovia</i> <i>Neoregelia</i> <i>Nidularum</i> <i>Ochagaria</i> <i>Orthophytum</i> <i>Portea</i> <i>Pseudaechmea</i> <i>Pseudananas</i> <i>Quesnelia</i> <i>Ronnbergia</i> <i>Stroptocalyx</i> <i>Ursulaea</i> <i>Wittrockia</i></p>

A Pitcairnioideae é normalmente referida como a mais primitiva entre as três subfamílias, apresentando plantas com hábito terrestre, flores com ovário súpero e escamas absorventes na maioria dos gêneros (MEDINA, 1990). Os representantes desta subfamília são equipados com sistemas radiculares bem desenvolvidos em relação aos membros das outras duas subfamílias (FORZZA, 1997), sendo reconhecido três gêneros (LEMOS, 1997).

A Tiliandisiodeae compreende plantas essencialmente epífitas; folhas com margem inteira; flores com ovário súpero ou raramente semi-ínfero (Glomeroptcairnia); sementes com tufo de apêndices plumosos nas extremidades. Possuem oito gêneros e 675 espécies. *Tillandsia* é o maior gênero (400), seguido da *Vriesea* (220). Alguns subgêneros foram elevados a gênero como *Racinaea* de *Pseudo-catopsis* e *Alcantarea* de *Vriesea*.

Quanto à subfamília Bromeliodeae, possui cerca de 32 gêneros e cerca de 425 espécies (LEME, 1997). Constituída por plantas terrestres, rupícolas e epífitas, geralmente herbáceas, variando de plantas delicadas e de pequeno porte, como *Tillandsia recurvata* (L.) L., com alguns centímetros de comprimento, até plantas de grande porte, como *Puya raimondii* Harms, encontrada nos Andes, que chega a atingir mais de 10 metros de altura (SMITH; DOWNS 1974; REITZ, 1983).

Os representantes da família apresentam caules geralmente contraídos, rizomas horizontais ou estolões, inflorescência geralmente vistosa e folhas distribuídas em roseta, usualmente com bainha alargada na base, propiciando a formação de um reservatório de água e nutrientes (REITZ, 1983), cujo papel ecofisiológico é de grande importância, tanto na nutrição das bromélias, como em constituir um micro ambiente onde habitam animais diversos. 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.

## **2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DAS BROMELIÁCEAS**

As bromélias geralmente são vistas como plantas de interesse ornamental, pois apresentam grande diversidade de espécies das mais variadas formas e cores, sob esse ponto de vista são responsáveis por um volume comercial significativo. Segundo Melo (1996) a utilização das bromélias no paisagismo ocorreu a partir do fenômeno “Burle Max” o traçado dos projetos paisagístico no Brasil, bem como as plantas neles especificadas, alterou-se profundamente e assim consolidou. A formalidade e a simetria do estilo francês, no qual eram utilizados arbustos de clima temperado, coníferas,

roseiras, grande variedade de flores anuais e espécies afins, cedeu definitivamente terreno para a sinuosidade de traçados e para o aspecto naturalista herdados dos jardins ingleses, cujas características foram realçadas em nosso país, pela biodiversidade tropical pertencentes às famílias Araceae, Musaceae, Palmae, Bromeliaceae e outras que invadiram nossos jardins, parques e praças, definindo volumes, dando ritmo as composições paisagísticas e acrescentando uma gama infinita de novas texturas e cores. Usadas como formações utilizadas como arranjos, funcionando como adornos vivos aplicados a outros elementos vegetais inseridos na paisagem, fixadas as rochas ou até mesmo, em esculturas, as bromélias conquistaram definitivamente seu lugar, auxiliando o paisagista na recriação de ecossistemas nas áreas verdes projetadas.

Outro aspecto de sua importância econômica é a utilização na alimentação, sucos, doces obtida do fruto de uma bromeliácea do gênero *Ananas*, na produção de fibras, como no caso do “caroá-verdadeiro”, *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez e na medicina natural, como digestiva, depurativa e com outras funções, pela utilização da enzima “bromelina” presente em algumas espécies do gênero *Bromelia*.

As bromélias são também bons indicadores ambientais. Nas regiões tropicais aparecem em sua maioria como espécies epífitas, que se encontram entre as primeiras plantas a serem afetadas pela degradação ambiental e pela derrubada de florestas, e entre as últimas a se instalarem nas áreas em recuperação.

Segundo Nadkarni (1991) além da significância, enquanto entidade biológica ressalta-se que as bromélias apresentam elevado grau de importância ecológica nos ecossistemas onde se inserem e afetam muitos aspectos do ecossistema que habitam: 1) contribuem com a sustentabilidade da diversidade do ecossistema, produção e ciclagem de nutrientes; 2) proporcionam fontes de energia e nutrientes a organismos associados, como pássaros polinizadores e formigas mutualistas; 3) atuam como indicadores globais de mudanças climáticas; 4) fornecem ao homem matéria-prima para a horticultura, para fins medicinais e valor econômico; 5) criam um ambiente para estudos observacionais e experimentais sobre uma ampla gama de

questões biológicas, incluindo a botânica sistemática, interação entre plantas, ecofisiologia e mecanismos de mudança evolutiva.

### 3. 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. 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 (REITZ, 1983; LORENZI, 2001; PAULA, 2000).

A *Aechmea fasciata*, originária do Brasil, especificamente do estado do Rio de Janeiro (BROMELIACEAE, 2008), apresenta crescimento epífita ou terrestre, inflorescência é muito durável, formada por brácteas cor-de-rosa, cheias de espinhos nas bordas, e flores roxas delicadas. Os frutos são pequenos e arredondados. A floração ocorre quando a planta está madura, após este período ocorre à emissão de brotações laterais e a planta morre. Muito indicada para a decoração de interiores durante a floração. Segundo Vitari (1994) é a mais conhecida e comercializada do gênero, seguida da *Guzmania*.

Quanto a *A. miniata* é uma planta epífita, cresce a uma altitude de 250 metros, originária do estado da Bahia. Apresentam folhas verdes, inflorescência com flores azuis pálidas, seguidas por baga laranja-avermelhado de longa durabilidade (BROMELIACEAE, 2008).

### 4. O GÊNERO *Vriesea*

*Vriesea* são bromeliáceas epífitas ou terrestres, bastante rústicas e que vegetam bem sob sombra moderada. Este gênero é composto de

aproximadamente 250 espécies, nativas da América do Sul, principalmente do Brasil (VRIESELA, 2008).

As plantas mais conhecidas deste gênero são em geral pequenas, com folhas macias, brilhantes, verdes ou avermelhadas e sem espinhos, podendo ter listras amarronzadas. As inflorescências variam quanto à forma, podendo ser espigadas, retas e achatadas ou pendentes e delicadas, sendo muito durável, podendo ser mantida em ambientes internos por longos períodos. As cores mais comuns das brácteas são o amarelo, o laranja e o vermelho (O JARDINEIRO, 2008).

Multiplica-se por separação das mudas que se formam entorno da planta mãe após a floração, quando estas atingirem 2/3 do tamanho adulto. Comercialmente multiplica-se por sementes. (O JARDINEIRO, 2008)

## 5. O GÊNERO *Bromelia*

*Bromelia* L. é um gênero botânico pertencente à família Bromeliaceae e subfamília Bromelioideae, embora seja comum denominar com o mesmo nome as espécies de outros gêneros da mesma família. As espécies deste gênero estão distribuídos pelas regiões tropicais dos continentes americanos, e sua principal característica é suas flores apresentarem um cálice muito profundo (BROMELIA, 2008).

A *Bromelia antiacantha* Bertoloni é de hábito terrestre, de 2m de altura que forma densos agrupamentos (reboleiras), apresentando características próprias de estrutura espacial (densidade, dispersão, distribuição) e de dinâmica populacional (REITZ, 1983; SANTOS, 2001). Ocorre nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (REITZ, 1983).

A espécie possui flores perfeitas e sua reprodução pode ser tanto sexuada como assexuada (vegetativa), emitindo um ou mais brotos laterais logo após o término do período floral (REITZ, 1983; SANTOS, 2001; SANTOS et al., 2004). Para a maioria das bromeliáceas, o final do ciclo reprodutivo representa o final aparente do seu ciclo de vida, podendo produzir sementes e indivíduos por via assexuada (brotações).

A floração é anual iniciando em dezembro com término entre o final de janeiro e início de fevereiro (REITZ, 1983), e embora seja uma espécie que atrai uma ampla gama de visitantes florais, as características destas confirmam que é uma espécie ornitófila, mas sem especialização para um polinizador exclusivo (SANTOS, 2001). A frutificação inicia em torno de fevereiro até o mês de junho. Por seus frutos serem amarelos e comestíveis a *Bromelia antiacantha* Bertoloni recebeu o nome popular de banana-do-mato (REITZ, 1983)

## **6. CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA**

Segundo Towill (2000), germoplasma é um termo que se refere ao conjunto de materiais hereditários de uma espécie cultivada, ou seja, a totalidade de genótipos disponíveis para o melhoramento genético de uma certa cultivar. Assim, o germoplasma abrange normalmente elevada diversidade genética, que deve ser preservada, entre outras razões, para garantir seu emprego em programas de melhoramento das culturas vegetais.

A conservação de germoplasma pode consistir na manutenção de coleções nos seus próprios locais de ocorrência, nesse caso chamada de conservação *in situ* e *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.

Os bancos ativos de germoplasma, para Vencovski (1986), objetivam garantir a diversidade genética das cultivares, efetuando a sua caracterização por diferentes metodologias e favorecendo o intercâmbio e disponibilização de genótipos entre diversas instituições.

### **6.1. Conservação *in vitro***

A conservação *in vitro* por cultura de tecidos, apesar de manter o germoplasma conservado por médios períodos, é uma metodologia que vem sendo aperfeiçoada na manutenção dos bancos ativos de germoplasma. Nas chamadas coleções de base, os genótipos são conservados por longos períodos, e nesse processo o material não é utilizado em pesquisas, cessão e intercâmbio.

Para Roca et al. (1991), em particular nas espécies propagadas vegetativamente, como é o caso das bromeliáceas, a manutenção de coleções de germoplasma *in vitro* é um método promissor à conservação de recursos genéticos. Valois et al. (2001), argumentam que a preservação *in vitro* possui diversas vantagens em relação à conservação no campo, tais como: menor risco de perda do germoplasma, maior qualidade fitossanitária, redução no custo de manutenção, rápida multiplicação e armazenamento, menor necessidade de espaço, disponibilidade imediata para propagação e facilidade de intercâmbio.

Withers e Williams, citados por Torres et al. (1998), informam que a utilização da conservação *in vitro* é indicada tanto por razões econômicas como práticas, sendo um componente importante também na preservação de espécies ameaçadas de extinção. Engelmann (1998), enfatiza que essa técnica é de elevado interesse para a conservação de germoplasma de espécies com sementes recalcitrantes, cultivares que se propagam vegetativamente, material geneticamente modificado e genótipos elite.

Salomão et al. (1997) destacam que um dos problemas da cultura *in vitro* é a baixa taxa de micropropagação em algumas espécies, além dos altos custos com mão-de-obra, já que é necessário realizar repicagens periódicas e constantes do material. Os níveis de micropropagação podem ser incrementados por uma seleção adequada da origem de explantes com maior capacidade organogenética, pela posição de implantação do explante no meio de cultura e pela manipulação da composição do meio de cultura.

A fim de diminuir o custo de manutenção das coleções *in vitro*, possibilitando economia de pessoal e reagentes, é possível a adoção de diversas técnicas, objetivando reduzir a velocidade de crescimento do germoplasma micropropagado. Todavia, vale salientar que essas técnicas, ao estender o intervalo entre os subcultivos, não devem comprometer a qualidade e viabilidade dos explantes.

Dentre as técnicas utilizadas para minimizar o crescimento *in vitro*, segundo Harding et al. (1997), destaca-se a aplicação de redutores de crescimento ao meio de cultura. Charrier et al. (1991), enfatizam que a aplicação de retardantes osmóticos e hormonais ao meio de cultura e a diminuição da temperatura de incubação das plantas, também contribuem para estabelecer o crescimento lento. Outro procedimento indicado para o mesmo objetivo é o de diminuir a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura.

A redução da temperatura nas salas de crescimento onde são incubados os clones micropropagados, aliada a diminuição na concentração dos macronutrientes e micronutrientes e da dosagem 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 várias culturas. São exemplos à uva, morango e batata (DODDS; ROBERTS, 1993); o kiwi (MONETTE, 1986); o brócoli (KUBOTA et al., 1996); a beterraba, batata-doce, mandioca e várias forrageiras (Souza, 1988); a maçã, pêra, ameixa e cereja (WILKINS et al., 1988); e o abacaxi (ZEE; MUNEKATA, 1992).

A eficácia destas técnicas varia de acordo com as características fisiológicas da espécie a ser conservada. Geralmente os explantes mais indicados para a conservação *in vitro* são os de origem meristemática, já que suas células são mais resistentes às baixas temperaturas e esses tecidos também apresentam maior estabilidade genética e qualidade fitossanitária.

Withers e Williams, citados por Torres et al. (1998), esclarecem que essas técnicas não são seguras para a conservação de células e calos, visto que, estas possibilitam elevada incidência de variação somaclonal e não são estáveis para a conservação a longo prazo.

Dentre as substâncias retardantes de crescimento, o ácido abcísico, por bloquear a ação das auxinas e giberelinas, seria uma alternativa para ser utilizado em protocolos de conservação. Entretanto, poucos são os relatos na literatura, quanto à utilização deste tipo de regulador no cultivo *in vitro*. Outro agente retardador do crescimento é o paclobutrazol, por atuar inibindo a síntese de giberelina. Contudo, segundo Canto et al. (2004), em trabalhos de conservação *in vitro* de abacaxizeiro, híbrido PE x SC60, o tratamento com regulador (PBZ) foi considerado o mais recomendado, pois apresentou menor crescimento e permitiu a manutenção de plantas em bom estado vegetativo durante um ano, sem

subcultivos intermediários. Entretanto, Vieira e Dornelas (1996) não recomendam a utilização dessas substâncias, sempre que possível, na conservação *in vitro*. Tais substâncias são muito dispendiosas e, por razões econômicas, podem inviabilizar o programa de conservação. Além disso, de maneira freqüente os reguladores vegetais são agentes responsáveis por provocar variação somaclonal, fenômeno que compromete a fidelidade genética do germoplasma.

Uma alternativa seria a utilização de reguladores osmóticos ao meio de cultivo. Charrier et al. (1991) destacam que os reguladores osmóticos, como o manitol, quando inseridos ao meio de cultura, reduzem o potencial hídrico do sistema, provocando um estresse osmótico que inibe a absorção de água por parte do explante, conseqüentemente desacelerando seu desenvolvimento. Faria et al. (2006), observaram ser possível conservar sob crescimento lento, microplantas de maracujazeiro em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, na ausência de sacarose.

Diante do exposto o objetivo do trabalho consistiu em estudar o efeito do carvão ativado e diferentes concentrações de ácido giberélico, na germinação *in vitro* de *Bromelia antiacantha* Bertoloni, *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Aechmea burle-marxii*, *Aechmea* sp. e *Vriesea* sp., bem como, estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* de *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata* utilizando diferentes fontes e concentrações de carbono.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, C. M.; DELWING, A. B.; KLEIN, G. N.; BARROS, I. B. I.; FRANKE, L. B. Considerações sobre a propagação e o uso ornamental de plantas raras ou ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. **Rev. Brasileira Agroecologia**, v.2, n.1, fev., p. 426-429, 2007.

BENZING, D.H. **Bromeliaceae: profile of na adaptative radiation**. Cambridge University Press. New York. 690p. 2000.

BIODIVERSITAS. Disponível em:

<<http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/grupo3fim.asp>> Acesso em: 31 de janeiro de 2008.

BIODIVERSITAS. Disponível em: <[http://www.biodiversitas.org.br/f\\_ameaca/](http://www.biodiversitas.org.br/f_ameaca/)>

Acesso em: 31 de janeiro de 2008.

BROMELIA . Disponível em:

< [http://pt.wikipedia.org/wiki/Bromelia\\_%28g%C3%A9nero%29](http://pt.wikipedia.org/wiki/Bromelia_%28g%C3%A9nero%29)> Acesso em: 20 de março de 2008.

BROMELIACEAE. Disponível em:

<<http://www.cloudjungle.com/epibook/Begon.html#Aech>> Acesso em :10 de fevereiro de 2008.

BRUMMETT, R. K. **Vascular Plant families and genera**. Royal Botanic Gardens, Kew, 804p. 1992.

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. 2004, n. 40, p. 717-720, 2004

CHARRIER, A., DEREUDDRE, J., ENGELMANN, F. The implications of biotechnology in germplasm conservation and utilization. Crop Genetic Resources of Africa. Vol II. N.Q. Ng ,P. Perrino, F. Attere, H. Zedan ed., Ibadan, Nigeria, IITA/IBPGR/UNEP/CNR, In: **Proceedings of an International Conference on Crop Genetic Resources of Africa**. pp. 279-286. 1991.

DINIZ, M. F., FERREIRA, L. T. **Bancos genéticos de plantas, animais e microrganismos**: garantia da segurança alimentar do terceiro milênio.

Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento. Local, ano 2, v. 13, p 34-38. mar./abr. 2000.

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

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. 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**, v. 28, p. 267-270, 2006.

FORZZA, R.C. PITCAIMIOIDEAE (**Bromelizaceae**) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. São Paulo, 1997, 150p. Dissertação (mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

HARDING, K.; BENSON, E.E.; CLACHER, K. **Plant conservation biotechnology an overview**. Agro-Food-Industry Hi-Tech, may-june, 1997.

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

LEME, E. M. C. **Canistrum-Bromelias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro. Salamandra. 107p.1997.

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

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa. **Plantarum**, 1085p. 2001.

MATA ATLÂNTICA. Disponível em:

<[http://pt.wikipedia.org/wiki/Mata\\_Atl%C3%A2ntica](http://pt.wikipedia.org/wiki/Mata_Atl%C3%A2ntica)> Acesso em: 31 de janeiro de 2008.

MEDINA, E. Eco-fisiologia y evolucion de las Bromeliaceae. **Boletín de la Academia Nacional de Ciencias**, v.59, p.71-100, 1990.

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

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

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

O JARDINEIRO. Disponível em:

([http://www.jardineiro.net/br/banco/vriesea\\_sp.php](http://www.jardineiro.net/br/banco/vriesea_sp.php)). Acesso em :10 de fevereiro de 2008.

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

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.

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.

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

SANTOS, D.S. **Biologia reprodutiva de Bromélia antiacantha Bertol. (Bromeliaceae) em uma população natural sob cobertura de floresta ombrófila mista.** 2001. 96p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SANTOS, D.S. et al. Variação no período de geminação de sementes em uma população natural de Bromélia *Antiacantha* (Bertol). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.3, p.35-41, 2004.

SMITH, L.B. & DOWNS, R.J. Bromelioideae (Bromeliaceae). p. 1493-2142. In: L.B. Smith & R.J. Downs (eds.). **Flora Neotropica**. v. 3. Hafner Press, New York. 1979.

SMITH, L.B. & DOWNS, R.J. Pitcairnoideae (Bromeliaceae). **Flora. Neotropica. Monagr.** 14 (1): 1-658. The New York Botanical Garden, New York. 1974.

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

TORRES, C.T.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/Embrapa – CNPH, 1998.

TOWILL, L. E. Germplasm preservation. In: TRIGIANO R.N. & GRAY, D.J. ed. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2nd. Edition. CRC Press, Boca Raton, p. 337-353, 2000.

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

VENCOVSKI, R. **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 18 p. 1986.

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

VITARI, M. Bromélias produção e proteção. **Ecologia e Desenvolvimento**, v. 3, n. 37, p. 15-17. 1994.

VRIESEA. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Vriesea>. Acesso em 10 de fevereiro de 2008.

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

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

ZILLER, S. R. Plantas exóticas invasoras: a ameaça da contaminação biológica. **Revista Ciência Hoje**, n. 178, p. 77 – 79. dez. 2001.

## CAPÍTULO 1

### **GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE BROMÉLIAS AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo ajustado e aceito para publicação no periódico científico Magistra

## GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE BROMÉLIAS AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO

**Resumo:** No Estado da Bahia vegetam muitas espécies nativas da família Bromeliaceae, que, no entanto, se encontram ameaçadas pelo alto nível de antropização, ampliação da fronteira agrícola e a exploração predatória de muitas bromélias de valor ornamental ou voltadas para a extração de fibra. Dessa forma, a demanda por ações que busquem a preservação desse recurso genético vem aumentando. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do carvão ativado e diferentes concentrações de ácido giberélico, na germinação de sementes *in vitro* de *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Aechmea burle-marxii*, *Aechmea* sp., *Vriesea* sp. e *Bromelia antiacantha* Bertoloni. Os resultados mostraram que o carvão ativado não influenciou na germinação das sementes e que os genótipos apresentaram exigências próprias, sendo o meio de cultura com GA<sub>3</sub> mais eficiente, para germinação de sementes de *Vriesea* sp. e *Aechmea* sp.. Por outro lado, as sementes de *Aechmea burle-marxii* e *Bromelia antiacantha* Bertoloni não germinaram nas condições estabelecidas no trabalho.

**Palavras chaves:** reguladores vegetais, carvão ativado, Bromeliaceae

## *IN VITRO* SEED GERMINATION OF THREATENED BROMELIAD OF EXTINCTION

**Abstract:** In the State of Bahia there are many native species from Bromeliads that however are threatened due to the agricultural expansion and the predatory exploration and also because these plants have an ornamental value and are used to fiber extraction. Therefore the demand for actions forward to germplasm preservation is increasing. The aim of this work was to evaluate the effect of the activated charcoal and different concentrations of giberelic acid on the *in vitro* germination of *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Aechmea burle-marxii*, *Aechmea* sp., *Vriesea* sp. and *Bromelia antiacantha* Bertoloni. The results showed that the activated charcoal didn't influence in the seeds germination and each genotypes presented particular demands. The more efficient medium culture for

*Vriesea* sp. and *Aechmea* sp. was supplemented with GA<sub>3</sub>. On the other hand, the seed of *Aechmea burle-marxii* and *Bromelia antiacantha* Bertoloni didn't germinate in the established conditions in this work.

**Key words:** growth regulators, activated charcoal, Bromeliaceae.

## INTRODUÇÃO

O risco da extinção de espécies biológicas torna-se cada vez mais presente e ameaçador. Embora a extinção seja considerada um processo natural e lento, o homem vem promovendo a uma elevada taxa, seja pelo extrativismo predatório ou destruição de habitats naturais. Dentre as espécies ameaçadas de extinção destacam-se as da família das bromeliáceas, principalmente, devido à destruição de seu habitat natural, a Mata Atlântica, Caatinga, Restinga e Manguezal (Nunes & Forzza, 2000) e à exploração extrativista, para suprir a demanda crescente destas no mercado de plantas ornamentais.

Espécies da família Bromeliaceae possuem um grande poder adaptativo, visto que o hábito de comportamento pode variar de terrestre a epífita, vegetam em vários tipos de habitat, desde ambientes com sombreamento total, aqueles expostos a pleno sol, sob umidade elevada a condições extremamente áridas, desde o nível do mar até altitudes elevadas, e em clima quente e tropical úmido a frio e subtropical seco. O Brasil detém a maior variabilidade genética de bromeliaceae, sendo que a Mata Atlântica é considerada como um dos grandes centros da diversidade dessa família. Esses processos predatórios, que geralmente não respeitam dinâmicas naturais de regeneração e sustentabilidade, têm promovido severos danos ambientais incluindo perda de diversidade biológica tanto de bromélias quanto de outras espécies que com elas co-existem (Bittencourt et al. 2002). A *Nidularium fulgens* Lemaire, *Racineacear aerrisicola* (Mez) Mez, *Aechmea apocalyptica* Reitz, *Vriesea hieroglyphica* (Carrière) E. Morren, *Vriesea pinottii* Reitz, *Vriesea guttata* Linden & André, *Vriesea unilateralis* (Backer) Mez e *Tillandsia linearis* Vell (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 1998) e *Aechmea fasciata* (Carvalho 2002) são espécies altamente comercializadas devido à beleza de sua inflorescência e das folhas, com eminente risco de extinção. Vale destacar o alto grau de endemismo que essa

família apresenta nos diferentes ecossistemas brasileiros em que ela ocorre, destacando ainda mais a importância da conservação desses germoplasmas.

O hábito epífita de muitas bromélias, que apresentam habilidade para obter nutrientes do ambiente e outros fluidos de floresta, associado com o micro-clima criado pela formação de cisternas nas folhas, pelo acúmulo de água e nutrientes, tornam um micro-habitat propício para muitos insetos e fonte de água para muitos animais e pássaros. As espécies terrestres também são muito eficientes em termos de ciclagem de nutriente, podendo tolerar locais pobres, absorvendo nutriente eficazmente (Aranda-Peres & Rodriguez, 2006). Além do que, a umidade estabelecida no interior dessas plantas propicia ainda, um ambiente favorável para a germinação das sementes de outras plantas (Carvalho, 2002).

As bromélias podem ser propagadas de forma sexuada ou assexuada. Na propagação assexuada, ou vegetativa, formam-se brotos a partir da planta mãe, que podem sair da base da planta por estolhos ou rizomas, ou do interior da própria roseta. O processo sexual envolve a formação de sementes, das quais podem ser obtidas grandes quantidades de plântulas (Rauh, 1979). Essa forma de propagação, embora seja muito lenta, visto que, apenas a maturação das sementes pode levar até um ano após a polinização, dependendo da espécie, garante a diversidade genética e a criação de novos híbridos.

A germinação de sementes *in vitro* de algumas bromélias já vem sendo relatada na literatura, com resultados diferenciados entre as espécies (Pompelli et al, 2001; Aranda-Peres, 2005). Além disso, o cultivo *in vitro* de sementes pode ser considerado uma técnica de grande importância na conservação de germoplasma de bromélias ameaçadas de extinção, visto que a emergência da planta ocorre em um tempo mais reduzido, quando comparado ao processo natural, além de um número muito maior de sementes germinarem (Mercier & Kerbauy 1995). Adicionalmente, a plântula obtida pode funcionar como matriz para um posterior processo de clonagem, produzindo plantas em larga escala e auxiliando na redução da atividade extrativista pela oferta de mudas.

Entretanto, cada genótipo apresenta exigências próprias para germinação, havendo freqüentemente uma ação cinagética, entre vários fatores, propulsora deste processo. Quando ocorrem condições favoráveis, é esperado certo nível de sincronismo de germinação de várias sementes de uma mesma espécie (Begon et al., 1990; Ferreira et al., 2001).

Dentre os reguladores vegetais as giberelinas ( $GA_3$ ) controlam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (Yamagushi & Kamiya, 2002). Promovem a germinação de sementes, atuando na ativação do crescimento vegetativo do embrião, na mobilização das reservas do endosperma e no enfraquecimento da camada de endosperma que circunda o embrião, favorecendo assim seu crescimento (Taiz & Zeiger, 2006). Aranda-Peres (2005) obteve bons resultados na germinação de sementes *in vitro* de espécies de *Vriesea*, em meio de cultivo suplementado com 10  $\mu M$  de ácido giberélico. Da mesma forma, existem relatos na literatura de que o uso de carvão ativado para o cultivo de embriões, promove melhores taxas de germinação, pela propriedade que tem de adsorver substâncias inibidoras do meio de cultivo (Gratapaglia & Machado 1998).

Em vista do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do carvão ativado e de diferentes concentrações de ácido giberélico, na germinação *in vitro* de *Antiacantha* Bertoloni, *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Aechmea burle-marxii*, *Aechmea* sp. e *Vriesea* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Planta do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMP/EMBRAPA).

Sementes retiradas de frutos maduros da bromélia *Antiacantha* Bertoloni, *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Aechmea burle-marxii*, *Vriesea* sp e *Aechmea* sp, cedidas pela fazenda Flores de Brotas/Irará-BA, foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e água destilada (2:1) por 20 minutos, seguida de três lavagens em água destilada e esterilizada em câmara de fluxo laminar. Uma vez desinfestadas as sementes foram incubadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 0,0; 1,0 e 10  $\mu M$  de  $GA_3$  e 0,0 e 1,0  $g L^{-1}$  de carvão ativado e solidificado com 2  $g L^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup>, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As culturas foram incubadas em sala de crescimento com

temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com condição luminosa de  $22 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de  $6 \times 3 \times 2$ , sendo seis espécies, três concentrações de ácido giberélico e presença ou ausência de carvão ativado com 10 repetições, sendo 25 sementes por repetição. Foram realizadas as avaliações quanto à percentagem de germinação e a velocidade de emergência, controlada diariamente até o 45º dia após a semeadura. Foi considerada como semente germinada aquela que apresentou a primeira folha. Para fins de cálculo do índice de velocidade de emergência, foi utilizada a fórmula sugerida por Maguire (1962):  $\text{IVE} = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$

Onde  $E_1$  = número de sementes emergidas;  $N_1$  = número de dias da semeadura até a emergência da primeira folha;

A percentagem de germinação e o índice de velocidade de emergência foram submetidos à análise de variância e testados a 5% de probabilidade comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE INC, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a análise de variância, o efeito do  $\text{GA}_3$ , das espécies, assim como a interação entre esses dois fatores foi significativo, ao contrário do carvão ativado que não influenciou nos resultados obtidos (Tabela 1). As maiores médias das taxas de germinação foram obtidas quando se adicionou  $\text{GA}_3$  ao meio de cultivo, independente da concentração utilizada, com médias de 59% e 58%, respectivamente, para as concentrações de  $1,0 \mu\text{M}$  e  $10 \mu\text{M}$  (Tabela 2, Figura 1), sem, no entanto, diferirem estatisticamente entre elas. A *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, apresentaram 100% de germinação, independente da concentração do regulador vegetal, havendo diferença de comportamento entre estes genótipos, seguidos da *Vriesea sp* com média geral de 76% e da *Aechmea sp* com 69%.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para percentagem de germinação de genótipos de Bromeliaceae, aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio
		% de Germinação
Concentração de GA <sub>3</sub>	2	19,1167*
Genótipo	5	5767,860*
Procedimentos **	1	4,050 <sup>ns</sup>
Concentração de GA <sub>3</sub> x Genótipo	10	17,590*
Concentração de GA <sub>3</sub> x Procedimentos	2	0,150 <sup>ns</sup>
Genótipo x Procedimentos	5	1,890 <sup>ns</sup>
Concentração de GA <sub>3</sub> x Genótipo x Procedimentos	10	0,130 <sup>ns</sup>
Resíduo	127	0,9318
CV(%)		5,61

\* \*Presença ou ausência de carvão ativado no meio de cultura. \* significativo a 0.05 de probabilidade, pelo teste de Tukey. ns não significativo.

Tabela 2. Taxas de germinação (%) de diferentes espécies de Bromeliáceas, aos 45 dias após o cultivo *in vitro*.

Genótipos	Concentrações de GA <sub>3</sub> (µM)			
	0	1	10	Média
<i>Vriesea sp</i>	75 b B	78 a B	74 b B	76 B
<i>Aechmea sp</i>	56 b C	74 a B	76 a B	69 C
<i>Aechmea burle-marxii</i>	ng*	ng	ng	ng
<i>Aechmea fasciata</i>	100 a A	100 a A	100 a A	100 A
<i>Aechmea miniata</i>	100 a A	100 a A	100 a A	100 A
<i>Antiacantha Bertoloni</i>	ng	ng	ng	ng
<b>Média</b>	55 b	59 a	58 a	

ng\* (não germinaram). Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.



Figura 1. Germinação de sementes *in vitro* de *Aechmea miniata* (A), *Aechmea fasciata* (B), *Aechmea sp* (C) e *Vriesea sp* (D).

As maiores percentagens de germinação para a *Vriesea sp* ocorreu na presença do regulador vegetal, com as concentrações de 1,0 e 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$ . Droste et al. (2005) obtiveram altas taxas de germinação com *Vriesea gigantea* e *V. philippocoburgii*, 99 e 89% respectivamente, em meio de cultura MS, na ausência de regulador vegetal. Para *Aechmea sp* o uso do regulador no meio de cultivo melhorou consideravelmente as taxas de germinação, evidenciando um claro efeito benéfico do  $\text{GA}_3$  sobre o evento. A *Aechmea burle-marxii* e *Antiacantha Bertoloni* não germinaram nas condições estabelecidas no trabalho, deixando evidente a necessidade de novos estudos para essas espécies. A não germinação de sementes pode ser devido a diferentes fatores, que podem inclusive intensificar processos de dormência, comuns na natureza e que muitas vezes funcionam como estratégia de sobrevivência (Dias, 2005). Dentre esses fatores, a luz, a temperatura e a umidade, entre outros, podem ser limitantes. Em caroá (*Neoglasiovia variegata* (Arr. Cam.) Mez., planta da família das

bromeliáceas, a luz parece ser um fator preponderante para a germinação das sementes *in vitro* característica de plantas com sementes fotoblásticas positivas (Silveira et al., 2007). De acordo com Socolowski & Takaki (2004) sementes que possuem fitocromo A podem germinar tanto sob luz quanto no escuro, porém as que possuem apenas fitocromo B só germinam em presença de luz. Como nas condições desse trabalho, as sementes foram mantidas em presença de luz, esse fator não deve ser o responsável pela não germinação de nenhuma das sementes das citadas espécies. Outro fator que deve ser averiguado é o estágio de maturação das sementes, que quando muito imaturas, podem se constituir em uma barreira para a germinação.

O início da germinação da *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata* (Beer.) Baker. ocorreu no 5º dia de monitoramento do experimento e o ponto máximo de germinação foi registrado no 30º dia. Para *Vriesea sp* e *Aechmea sp*, o início da germinação ocorreu no 10º dia após os genótipos mencionados acima e o máximo foi verificado aos 45 dias nos diferentes tratamentos (Figura 2). Droste et al. (2005) utilizaram pré-tratamento a frio, 4°C por 7, 14 e 21 dias, para induzir mais rapidamente o início da germinação, verificaram que o pré-tratamento não influenciou na germinação, sendo preponderante a resposta do genótipo.

A germinação gradual, ou seja, ao longo do tempo, pode ser devido a vários fatores, como diferentes estádios de maturação das sementes de uma mesma baga, anormalidades de embrião, deformação de endosperma, assim como, a dormência que é um mecanismo presente em sementes de espécies para garantir sua perpetuação em condições adversas. Dentre as bromeliáceas, muitas espécies, principalmente, as de ocorrência em biomas com condições adversas, como é o caso da Caatinga, possuem mecanismos de dormência especialmente para evitar a germinação em períodos de longa estiagem, evitando dessa forma a perda da semente e garantindo sua reprodução no momento adequado (Dias, 2005).

O teste de média mostrou que a adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura foi benéfica para incrementar a velocidade de emergência, assim como as espécies respondem de forma diferenciada a esses tratamentos, como resultado da interação entre esses fatores. Observou-se que a concentração de 1,0 µM GA<sub>3</sub>, proporcionou um índice de velocidade de emergência ligeiramente maior na média geral, embora não diferindo estatisticamente da concentração de 10 µM. A

*Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata* apresentaram maior velocidade de emergência (5,7) (Tabela 3), sendo este significativamente diferente dos demais genótipos, independente das concentrações do regulador vegetal. Exceto para a bromélia *Vriesea sp*, em que o meio de cultura suplementado com 1,0 e 10 $\mu$ M de GA<sub>3</sub>, induziu um índice velocidade de emergência de 2,10 e 1,90, respectivamente, ( $P \leq 0,005$ ). Os demais genótipos não revelaram incremento do índice velocidade de emergência na presença do regulador vegetal ( Tabela 3). Estes resultados demonstram que as sementes de *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, apresentam maior vigor, favorecendo, portanto, o crescimento inicial das plântulas, e conseqüentemente possibilitando maior condição de sobrevivência destas espécies, em seu habitat natural.

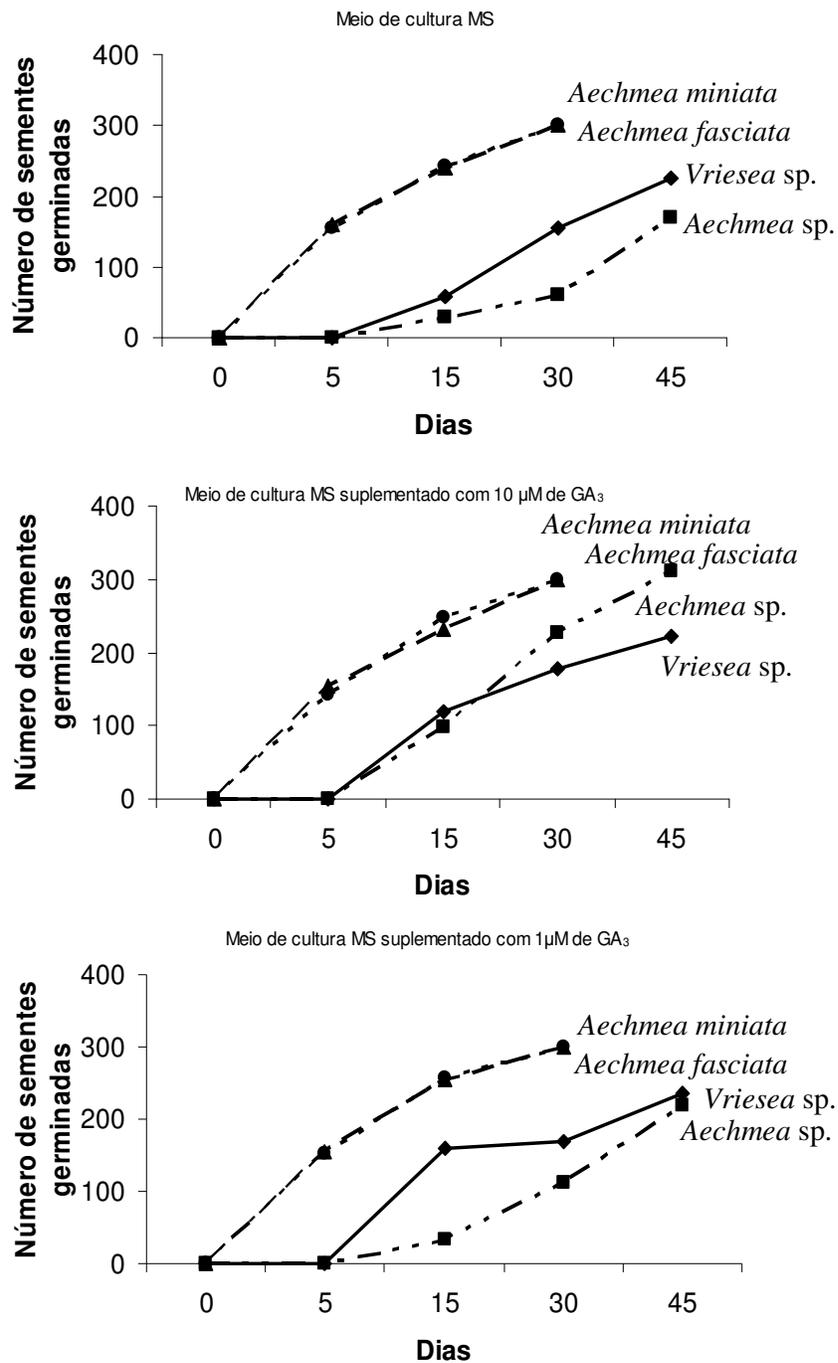


Figura 2. Número médio de sementes germinadas e tempo de germinação em meio acrescido de 0,0; 1,0; e 10 μM de GA<sub>3</sub>.

Tabela 3. Índice de velocidade de emergência de genótipos de Bromeliáceas, cultivadas *in vitro*.

Genótipos	Concentrações de GA <sub>3</sub> (µM)			
	0	1	10	Média
<i>Vriesea</i> sp.	1,30 bB	2,10 aB	1,90 aB	1,766 B
<i>Aechmea</i> sp.	1,0 aB	1,0 aC	1,0 aC	1,000 C
<i>Aechmea fasciata</i>	5,80 aA	5,90 aA	5,60 aA	5,766 A
<i>Aechmea miniata</i>	5,70 aA	5,90 aA	5,70 aA	5.766 A
<b>Média</b>	3,450 b	3,725 a	3,550 ab	

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Dado que as condições ambientais relativas à iluminação, temperatura e umidade na sala de crescimento eram homogêneas para todos os tratamentos, observou-se que as diferenças registradas entre os tratamentos podem ser devidas tanto à variabilidade natural intra e interespecífica quanto ao fator diferencial GA<sub>3</sub>. Aranda-Peres & Rodriguez (2006) verificaram que sementes de *Aechmea* facilmente geminaram *in vitro*, quando comparada com espécies de Tillandsioideae (*Vriesea* e *Racinaea*), que apresentaram baixa taxa de germinação. Os mesmos autores relatam que a percentagem de germinação e índice de velocidade de emergência, para as bromélias *V. unilateralis* (92%), *V. fruburguensis* (48%) e *R. aerisicola* (62%), foram superiores em meio de cultura MS acrescido de 10 µM de GA<sub>3</sub>.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Menescal (1994) e Miranda (1998) quando afirmam que as bromeliáceas são facilmente propagadas por sementes, atingindo em torno de 100% de germinação para *A. tocantina*. Altas taxas de germinação *in vitro* foram obtidas com *Neoregelia cruenta* (74.3 %), (Carneiro et al. 1999), *Tillandsia eizii.*, (86,7%), (Pickens et al. 2003), *Aechmea nudicaulis* (L) Grisebach (90%) e *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Schultes F.) Mez (90%) (Bromeliaceae), (Pinheiro & Borguetti 2003).

## CONCLUSÕES

1. A elevada disponibilidade de sementes e o percentual de germinação obtidos, sugerem que a propagação *in vitro* de *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Vriesea* sp. e *Aechmea* sp., por meio de sementes é viável.

2. A adição de 1.0  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  no meio de cultura MS foi eficiente para a germinação e índice de velocidade de germinação para *Vriesea* sp.

3. O maior índice de emergência foi verificado para os genótipos *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, aos cinco dias de instalação do experimento, independente da concentração do ácido giberélico.

4. A adição de carvão ativado no meio de cultura não influenciou na taxa de germinação *in vitro* das espécies estudadas.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto, a CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado e a UFRB pela Pós-graduação em Ciências Agrárias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ A. P. M.. Bromeliad. In: ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. IV Piracicaba: Global Science Books,. Cap. 73, p. 644-655. 2006.

ARANDA-PERES, A. N. **Cultivo *in vitro* de bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, avaliação nutricional e substrato para aclimação**. 2005. 125f. (Tese Doutorado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

BEGON, M. J.; HARPER, L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology: individuals, populations, and communities**. Massachusetts (USA): Rand McNally, p. 945, 1990.

BITTENCOURT, A. M.; PÖLZI, P. F. K.; BLUM, C. T.; HOFFMANN, T.; SANTOS, A. J. Aspectos econômicos das bromélias no Estado do Paraná. In: **Congresso ibero-americano de pesquisa e desenvolvimento de produtos florestais**, Curitiba. Caderno de Resumos. Curitiba: UFPR, p. 134, 2002.

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

CARVALHO, L. F. N. **O cultivo da bromélia**. São Paulo: TJV, p.32, 2002.

DIAS, D. C. F. S. Dormência em sementes: mecanismos de sobrevivência das espécies. **Revista Seed News**. n.4, 2007.

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**. v.48, n.5, p. 717-722, 2005.

FERREIRA, A. G.; CASSOL, B.; ROSA, S. G. T.; SILVEIRA, T. S.; STIVAL, A. L.; SILVA, A. A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.15, n. 2, p. 231-242, 2001.

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.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p.176-177, 1962.

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

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In - **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, ed. Bajaj Y.P.S. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 40, p. 43–57, 1997.

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

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

NUNES, J. V. C.; FORZZA, R. C. . Bromélia. In: **I Seminário Nacional de Recursos Florestais da Mata Atlântica**, São Paulo. Anais do Primeiro Seminário Nacional de Recursos Florestais da Mata Atlântica, p. 40-44, 2000.

PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; RAMOS, J.D. Influência do GA<sub>3</sub> e do carvão ativado sobre o enraizamento in vitro de embriões de laranja 'Natal'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 10, p. 1477-1482, 1990.

PICKENS, K.A.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y.; WOLF, J.H.D. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* in vitro. **HortScience** v.38, p.101-104, 2003.

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

POMPELLI, M. F.; PINTO, T. H.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Dyckia distachya* L. B. Smith: uma bromélia ameaçada de extinção. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL. 8, Ilhéus. **Resumos...** 1 CD-ROM. Seção Artigos, 2001.

RAUH, W. **Bromeliads for home, garden and greenhouse.** London: Blendford Press, 58 p. 1979.

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

SECRETARIA DO ESTADO DO MEIO AMBIENTE. Documento Ambientais. Espécies da flora ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo: Lista preliminar. São Paulo, p.24. 1998.

SILVEIRA, D.G.; SOUZA, F.V.D.; PELACANI, C.R.; SOUZA, A.S.; SANTANA, R.F.; LEDO, C.A.S. Micropropagation and *in vitro* conservation of (*Neoglasiovia variegata* (Arr. Cam.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** (Publicação aceita pela revista em 2007).

SOCOLOWSKI, F. AND TAKAKI, M. Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don - Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47: (5), 785-792, 2004.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3ª edição, Porto Alegre: Artmed. p. 705, 2006.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; SUN, T. Distinc cell-specific expression patterns of early and late gibberellins biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. **Plant Journal**, Oxford, v. 28 p. 443-453, 2001.

## CAPÍTULO 2

### **CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Revista Bragantia

## CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*

**Resumo:** *Aechmea fasciata* e *A. miniata* são espécies de bromélias nativas do Brasil e que têm um grande potencial para uso como planta ornamental, além de uma relevante importância ecológica. Considerando a grande devastação de Mata Atlântica, atualmente com 7,3% de sua área original preservada e onde cerca de 70% das bromélias são endêmicas é importante o estabelecimento de métodos de conservação *ex situ* com o objetivo de preservar esse germoplasma e evitar uma erosão genética irreversível. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações dos reguladores osmóticos sacarose e manitol na conservação *in vitro* de *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, assim como a capacidade morfogenética dessas espécies após a conservação *in vitro*. Os resultados mostraram que foi possível conservar sob condições de crescimento reduzido, plantas de *A. fasciata* e *A. miniata* por doze meses em meio de cultura ½ MS suplementado com 43,82 mM ou 21,85 mM de manitol, e mantidas sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e intensidade de fluxo de fótons de  $22 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . O crescimento, após longos períodos de conservação é um dos parâmetros que medem o sucesso dessa técnica para a conservação de germoplasma. As diferentes fontes de carbono não inviabilizaram a capacidade de recuperação das plantas, mas influenciaram suas taxas de multiplicação. A concentração de 21,85mM de sacarose apresentou a mais baixa eficiência para conservação.

**Palavras chave:** reguladores osmóticos, morfogênese, multiplicação *in vitro*, ornamentais.

## *IN VITRO* CONSERVATION OF *Aechmea fasciata* AND *Aechmea miniata*

**Abstract:** *Aechmea fasciata* and *A. miniata* are species of bromeliads native from Brazil with high potential to use as ornamental plants and with relevant ecological importance. Regarding to the great devastation of Atlantic Forest currently with only 7,3% of original area preserved and where near 70% of bromeliads are endemics is important to establish *ex situ* conservation methods with the aim to

preserve this germplasm and to prevent a irreversible genetic erosion. The aim of this work was to evaluate the effect of different concentrations of the osmotic regulators sucrose and manitol on *in vitro* conservation of *Aechmea fasciata* and *Aechmea miniata*, and the morphogenetic capacity of these species after in vitro conservation period. The results showed that it was possible to conserve under low growth conditions, plants of *A. fasciata* e *A. miniata* for twelve month in ½ MS media culture supplemented with 43,82 mM or 21,85 mM of manitol, and under photoperiod of 16 hours, temperature of  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and light intensity of  $22 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . The growth, after long periods under in vitro conservation, is one of parameters to measure the success of this technique to germplasm conservation. The different concentrations of carbon source didn't restrain the recover capacity of plants but influenced the multiplication rates. The 21,85 mM concentration of sucrose presented the lower efficiency result to conservation.

**Key words:** osmotic regulators, morphogenic, *in vitro* multiplication, ornamental.

## INTRODUÇÃO

Bromeliaceae constitui uma grande família botânica (56 gêneros e 2880 espécies) composta principalmente por plantas epífitas (BENZIG, 2000), crescendo quase que exclusivamente apenas nas Américas, sendo, portanto designados como neotropicais. A maioria destas ocorre na América do Sul com a maior diversidade específica sendo encontrada na Floresta Atlântica brasileira (Ca. 1200 espécies) (LEME, 1998; ARAGÃO, 1999; GROSSI, 2000; BENZIG 2000). Distribuem-se desde o Chile e Argentina, na América do Sul, através da América Central e Caribe, alcançando o seu limite norte próximo à Virginia no sudeste norteamericano. Apenas uma espécie (*Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms e Mildbraed) é encontrada na costa oeste africana.

Nas últimas décadas, as bromélias tornaram-se mais amplamente empregadas como plantas ornamentais. Originalmente encontradas apenas em jardins botânicos ou de colecionadores europeus ganharam popularidade entre paisagistas e jardineiros devido à beleza de suas formas e cores, durabilidade das inflorescências, baixa demanda de cuidados e fácil adaptabilidade a jardins pequenos (BENZIG, 2000; KISS, 2001; BSI, 2005; SCHOELLHORN, 2005).

Atualmente as bromélias são consideradas como elementos requintados e exóticos de jardins ao redor do mundo (STEENS, 2003 e BRANDIES, 2004). O uso ornamental de bromélias no Brasil foi iniciado a partir da década de setenta, quando *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, uma planta nativa do Rio de Janeiro, despertou grande procura por parte de consumidores de plantas ornamentais. A insuficiência de produção de plantas desta espécie provocou o extrativismo, que também se difundiu para outras espécies de menor expressão comercial. Iniciava-se nesta época, portanto, o ciclo de extrativismo de bromélias com finalidade lucrativa no Brasil.

Frente à 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 e pouco investimento se fez no sentido de implementar sistemas de cultivo destas plantas (SBB, 2005). 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 de bromélias e de outras espécies co-existentes (NAHOUM, 1994; LEME, 1998 e ANACLETO, 2001).

Dentre as 107 espécies oficialmente listadas como extintas ou ameaçadas de extinção, 15 são bromélias (BRASIL, 1992), a exemplo da *Aechmea fasciata* (CARVALHO, 2002) *Aechmea apocalyptica* Reitz e *Vriesea pinottii* Reitz (BRASIL, 1992).

Simultaneamente ao extrativismo de bromélias, ocorre a exploração de outras espécies florestais que também possuem interesse econômico. Também, a comercialização das bromélias oriundas do extrativismo é praticada por um preço insatisfatório em função da baixa qualidade visual que as plantas apresentam, uma vez que estas são retiradas das florestas e disponibilizadas para venda sem que recebam tratos culturais adequados. Assim, passa a ser uma atividade fortuita e sem eficiente conexão com potenciais mercados receptores e sem regularidade de comercialização, porém mesmo assim determina um expressivo acréscimo financeiro nas famílias envolvidas com o extrativismo, ampliando desta forma a pressão extrativista (NEGRELLE et al., 2005). Além dos fatores mencionados acima, a escassez de estudos sobre a biologia reprodutiva, também tem facilitado sua exploração extrativista.

A conservação de espécies depende da manutenção de sua diversidade genética no habitat natural (*in situ*), e de reservas genéticas *ex situ*, ou bancos de germoplasma. Bancos de germoplasmas podem ser compostos de coleções de plantas vivas, sementes ou cultura de tecidos (VALOIS et al., 2001).

A possibilidade de obter plantas inteiras a partir de células isoladas, tecidos e órgãos de plantas, usando técnicas de cultura de tecidos, levou ao estabelecimento de sistemas de micropropagação e dos bancos de germoplasma *in vitro*, auxiliando assim, de forma significativa, a preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção.

O êxito da propagação *in vitro* depende de diversos fatores que devem ser controlados adequadamente durante o processo, tais como, o tipo de explante, o genótipo, os meios de culturas, os reguladores vegetais e as condições ambientais.

No que concerne à conservação *in vitro*, a cultura de tecidos foi concebida como uma alternativa para a conservação de espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias ou aquelas propagadas vegetativamente (ENGELMANN, 1991) como no caso das bromeliáceas. O objetivo é aumentar ao máximo o período de subcultivo ou estendê-lo indefinidamente; dessa forma se reduz a mão-de-obra e o espaço necessários, além de proporcionar ao melhorista acesso imediato a todo o germoplasma da coleção (VIEIRA, 2002).

No desenvolvimento desse método, dois procedimentos têm sido adotados: o crescimento lento – que envolve a depressão do metabolismo das plantas e a da supressão completa do crescimento por armazenamento em temperaturas ultra-baixas, a chamada criopreservação (SANTOS, 2000).

O método do crescimento lento consiste em reduzir o metabolismo da planta, aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plântulas. Na redução do metabolismo das plantas, têm-se utilizado como estratégia, modificações nas condições físicas (temperatura) ou químicas do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (ROCA et al., 1991).

A baixa temperatura como alternativa para armazenamento *in vitro* de células e órgãos de plantas tem sido aplicada amplamente e com sucesso em kiwi (MONETTE, 1986), maçã, pêra, ameixa e cereja (WILKINS et al., 1988), uva,

morango, batata (DODDS e ROBERTS, 1993), beterraba, batata-doce, mandioca, várias forrageiras (SOUZA, 1988), abacaxi (ZEE e MUNEKATA, 1992), brócolis (KUBOTA et al., 1996) e cana de açúcar (LEMOS et al., 2002).

Com relação aos agentes osmóticos, tais como o manitol, sorbitol e sacarose, poucos são os relatos encontrados na literatura. Segundo WITHERS e WILLIAMS (1998), a concentração de 4% de manitol tem sido utilizada com sucesso para conservar propágulos de espécies de propagação clonal como tubérculos e raízes. FARIA et al. (2006) observaram ser possível conservar sob crescimento lento, microplantas de maracujazeiro em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, na ausência de sacarose.

Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos têm sido animadores, e será possível desenvolver um método adequado de crescimento lento para novas espécies.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações dos reguladores osmóticos, sacarose e manitol na conservação *in vitro* de *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, bem como testar a capacidade morfogênica, destas espécies.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Planta do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMP/EMBRAPA).

### **1. Influência de diferentes fontes e concentração de carbono na conservação *in vitro* de *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*.**

Sementes retiradas de frutos maduros da bromélia, *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, cedidas pela fazenda Flores de Brotas/ Irará-BA, foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e água destilada (2:1) por 20 minutos, seguida de três lavagens em água (destilada e autoclavada) na câmara de fluxo laminar. Uma vez desinfestadas as sementes foram incubadas em frascos de vidro (100 x 70 mm) com 25 mL do meio de cultura

MS (MURASHIGE e 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 antes da autoclavagem. As culturas foram incubadas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C em condição luminosa de 22 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

Microplantas com aproximadamente 3 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 com ½ das concentrações dos macronutrientes, solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> e suplementado com 87,64 mM, 43,82 mM e 21,85 mM de sacarose ou manitol, onde permaneceram por doze meses. As culturas foram incubadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2X2X3 (duas espécies, duas fontes de carbono e três concentrações) com 20 repetições, sendo um explante por cada tubo. A cada 60 dias foi avaliado o comprimento médio 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 médio de raízes (mensurado pela contagem das raízes individualmente, desconsiderando-se aquelas menores que 1 mm), relação parte aérea/ raiz (mensurado pelo quociente entre matéria seca da parte aérea e sistema radicular), número total de folhas (mensurado pela contagem das folhas individualmente), coloração das folhas, matéria da parte aérea seca e matéria do sistema radicular seco. A variável coloração das folhas foi atribuída a seguinte escala de notas: 1- folhas totalmente verdes e 2- folhas amareladas (senescente). Para a análise da matéria seca as plantas foram retiradas do frasco de meio de cultura, mergulhada três vezes em água destilada. Após o enxágüe separou-se a parte aérea e sistema radicular e acondicionou-se em sacos de papel 'Kraft' e secas em estufas dotadas de sistema com circulação forçada e renovação de ar, na temperatura de 70°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 as variáveis número médio de raízes e número médio de folhas senescentes as médias foram transformadas para  $\sqrt{v + 0.5}$  visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

## **2. Capacidade responsiva da *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*, em função de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP).**

Segmentos do talo das plantas provenientes dos meios de conservação após 12 meses de cultivo foram incubadas em meio de cultura MS, com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, solidificado com  $2 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup>, suplementado com  $3,04 \text{ } \mu\text{M. L}^{-1}$  de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,00; 8,87; 17,74; e  $26,63 \text{ } \mu\text{M. L}^{-1}$  de benzilaminopurina (BAP). Foram colocados 3 explante por frasco (100 x 70 mm) com 25 mL do meio de cultura.

O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  (utilizando-se KOH ou HCl 0,1 N), antes da autoclavagem à temperatura de  $121 \text{ } ^\circ\text{C}$  por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ , sob condições de fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons  $22 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Foram realizados quatro subcultivos a cada 45 dias, no período de seis meses, sendo avaliado os seguintes parâmetros: a) percentagem de explante responsivo (mensurado pelo número de explante que intumesceram e/ou emitiram brotações), b) número médio de brotos/explante (mensurado pela contagem individual das brotações em cada explante) e c) comprimento médio das brotações (mensurado com auxílio de régua graduada em centímetro, considerando-se a medida compreendida entre a base do explante e a extremidade da maior folha).

Considerou-se na avaliação dos parâmetros, o efeito residual das concentrações e tipos dos osmoreguladores, na capacidade responsiva das bromeliáceas em estudo.

O delineamento foi inteiramente casualizado num esquema fatorial de  $2 \times 4$  (duas espécies x quatro concentrações de BAP) sendo cada tratamento constituído de 5 repetições, onde cada frasco com 3 explantes, 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). Para as variáveis, número médio das brotações e comprimento médio das brotações, as médias foram transformadas

para  $\sqrt{y + 0,5}$  - SQRT ( Y + 0,5 ) visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dados apresentados nas Tabelas 1 e 2 indicam que os açúcares utilizados como reguladores osmóticos e fonte de carbono tiveram influência significativa nas variáveis estudadas, exceto quanto ao número médio de raiz e massa seca do sistema radicular, no caso da *A. fasciata*, e além desses, a massa seca total para *A. miniata*. Os tratamentos com 43,82 mM e 21,85 mM de sacarose ou manitol resultou nas menores médias. Entre as fontes de carbono, o manitol proporcionou os menores comprimentos da parte aérea e consequentemente massa seca da parte aérea, independente da espécie, sendo o comprimento médio de 3,99 cm e 6,05 cm, respectivamente para *A. fasciata* e *A. miniata*.

Tabela 1. Médias das variáveis comprimento médio da parte aérea (CMPA), número médio de raízes (NMR), massa da parte aérea seca (MPAS), massa da raiz seca (MRS), massa total seca (MTS) e relação parte aérea/ raiz de *Aechmea fasciata*, aos 12 meses de cultivo *in vitro*.

TRATAMENTOS mM L <sup>-1</sup>	CMPA (Cm)	NMR (unidade )	MPAS (mg/planta)	MRS (mg/planta)	MT S (mg)	Relação parte aérea/raiz	
Sacarose	87,64	7,24 a	5,9 a	2,12 a	2,67 a	4,79 a	0,79
	43,82	4,84 b	4,25 b	1,42 b	2,19 b	3,61 b	0,65
	21,85	4,51 b	4,25 b	1,32 b	2,04 b	3,36 b	0,65
<b>Média</b>	<b>5,53 A</b>	<b>4,8 A</b>	<b>1,62 A</b>	<b>2,3 A</b>	<b>3,92 A</b>	<b>0,70</b>	
Manitol	87,64	4,0 b	5,9 a	1,17 a	2,67 a	3,84 a	0,44
	43,82	3,98 b	4,25 b	1,11 a	2,19 b	3,30 b	0,51
	21,85	4,0 b	4,25 b	1,17 a	2,04 b	3,21 b	0,57
<b>Média</b>	<b>3,99 B</b>	<b>4,8 A</b>	<b>1,13 B</b>	<b>2,3 A</b>	<b>3,45 B</b>	<b>0,51</b>	
cv(%)	18,50	20,70	6,89	7,81	12,91		
Teste F	*	ns	*	ns	*		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúscula entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ns não significativo.

Tabela 2. Médias das variáveis comprimento médio da parte aérea (CMPA), número médio de raízes (NMR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MST) e relação parte aérea/ raiz de *Aechmea miniata*, aos 12 meses de cultivo *in vitro*.

TRATAMENTOS mM L <sup>-1</sup>	CMPA (Cm)	NMR (unidade )	MPAS (mg/planta)	MRS (mg/planta)	MT S (mg)	Relação parte aérea/raiz	
Sacarose	87,64	7,52 a	4,25 a	2,20 a	1,89 a	4,09 a	1,16
	43,82	6,60 b	4,25 a	1,94 b	1,89 a	3,83 b	1,03
	21,85	6,0 b	4,25 a	1,76 b	1,89 a	3,63 b	0,93
<b>Média</b>	<b>6,70A</b>	<b>4,25 A</b>	<b>1,97 A</b>	<b>1,89 A</b>	<b>3,87 A</b>	<b>1,04</b>	
Manitol	87,64	6,80 a	5,9 a	2,0 a	2,63 a	4,63 a	0,76
	43,82	5,90 b	4,25 b	1,73 b	1,89 b	3,62 b	0,92
	21,85	5,45 b	4,10 b	1,59 b	1,89 b	3,43 b	0,84
<b>Média</b>	<b>6,05 B</b>	<b>4,75 A</b>	<b>1,77 B</b>	<b>2,11 A</b>	<b>3,89 A</b>	<b>0,84</b>	
cv(%)	18,50	20,70	6,89	7,81	12,91		
Teste F	*	ns	*	ns	*		

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas para cada fonte de carbono, e maiúscula entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ns não significativo.

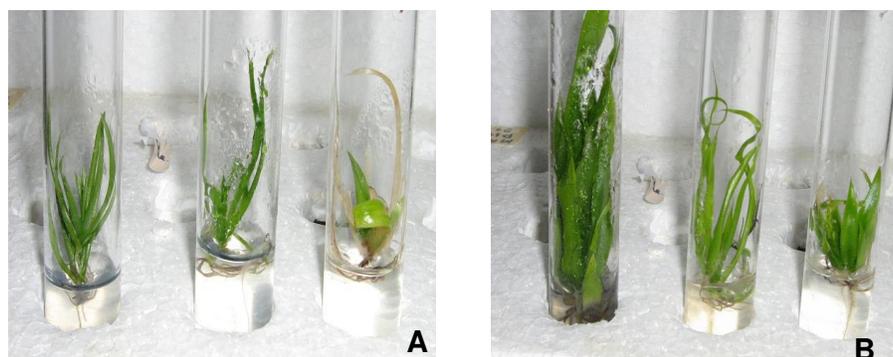
O uso de fontes alternativas de carbono, em lugar da sacarose, amplamente usada no cultivo *in vitro* de várias espécies, assim como a redução nas concentrações habitualmente usadas desse açúcar, são procedimentos que vêm sendo utilizados para a redução das atividades metabólicas de plantas *in vitro* com objetivo de conservação. Nesse trabalho, o uso do manitol proporcionou os melhores resultados considerando esse objetivo, visto que, de acordo com as variáveis avaliadas, promoveu o desenvolvimento mais lento das plantas em ambas espécies. Esse tratamento ao final dos 12 meses, apresentou as menores médias na relação parte aérea/raiz, 0,51 e 0,84 para *A. fasciata* e *A. miniata*, respectivamente. Segundo DANIEL et al. (1997), valores próximos a 0,5 são considerados bons quocientes como indicadores de proporcionalidade no desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular.

Resultados similares foram obtidos por SOUZA et al. (2007) que verificaram ser possível conservar sob crescimento reduzido microplantas de *Ananas comosus var. erectifolius* (= *lucidus*) em meio de cultura ½ MS utilizando 43,82 mM de manitol como fonte de carbono. Na conservação *in vitro* de batata, assim como em *Othophyidium mucugense* a concentração de 87,64 mM de manitol

proporcionou as menores taxas de crescimento, ainda que, no caso da orquídea, os açúcares maltose e glicose também tenham proporcionado resultados interessantes, possibilitando o prolongamento dos intervalos entre subcultivos (FORTES e PEREIRA, 2001; LIMA, 2008). FARIA et al. (2006), entretanto, trabalhando com maracujá obtiveram melhores resultados na redução do crescimento das plantas *in vitro* ao usarem sorbitol, em lugar de sacarose.

Por outro lado, a associação de modificações na fonte de carbono, à alterações de temperatura pode proporcionar resultados positivos na redução do metabolismo das plantas *in vitro* como o que foi obtido por LEMOS et al.(2002) na conservação *in vitro* de cana de açúcar, onde o meio de cultura suplementado com 26,71 mM de manitol, associado a 29,23 mM de sacarose, sob temperatura de 15°C e 25°C possibilitou a conservação *in vitro* das plantas por um período de 12 meses.

As duas espécies estudadas apresentaram diferenças na resposta morfogênica *in vitro*. Observa-se que a *A. miniata* apresentou maior desenvolvimento *in vitro*, (Figura 1A e 1B), com uma diferença no desenvolvimento da parte aérea de 1,17 cm no meio de cultura suplementado com sacarose e 2,06 cm em manitol, comparada a *A. fasciata*. (Figura 1C). Portanto, estes resultados revelaram que o comportamento *in vitro* foi diferente para cada espécie. Resultados semelhantes quanto ao comportamento diferenciado de genótipos foram relatados por FARIA et al. (2006), em trabalhos de conservação *in vitro* em maracujá. BELLINTANI (2006), em propagação de bromélias, observa a diferença entre algumas espécies na resposta morfogênica e relata que tal comportamento pode estar relacionado com as características genéticas de cada espécie.



□ *A. fasciata* □ *A. miniata*

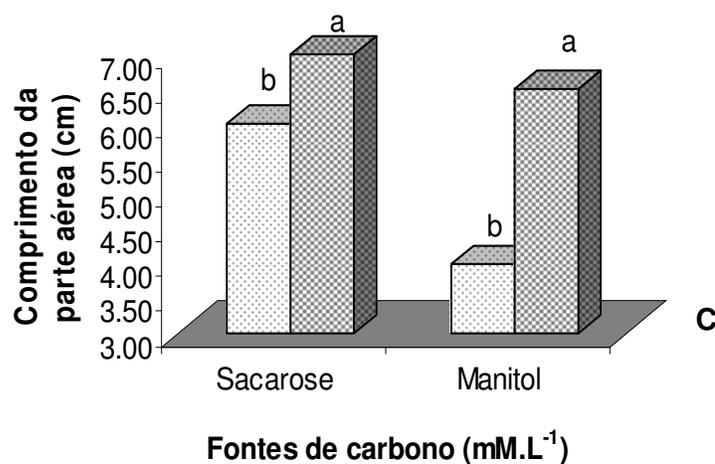


Figura 1. Aspectos morfológicos das plantas, *A. fasciata* (A), *A. miniata* (B) e comprimento médio da parte aérea (C), conservadas *in vitro*, após um ano de cultivo, em diferentes fontes de carbono. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas barras não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Algumas espécies de bromélias *in vivo* têm crescimento lento quando comparado a outras espécies vegetais, devido ao mecanismo de fixação do carbono durante a fotossíntese (RAVEN et al., 2001). Segundo MALDA et al. (1999), espécies com mecanismos CAM de fixação de carbono normalmente são plantas de crescimento lento, capacidade reprodutiva e condições de floração limitada.

Com relação ao comportamento das espécies ao longo do período de cultivo verificou-se que houve um maior incremento no comprimento da parte aérea no primeiro mês de cultivo, tanto para a *A. fasciata*, quanto para a *A. Miniata*

(Figura 2). A partir de então, exceto para *A. fasciata*, observou-se um padrão uniforme de desenvolvimento até aos 12 meses de cultivo. Em todas as situações o manitol foi mais eficiente para a conservação sob condição de crescimento lento, não apenas sob o ponto de vista em manter um incremento praticamente nulo, em torno de 4,0 cm para *A. fasciata* e 6,0 cm para *A. miniata*, de crescimento ao longo do cultivo, como também por proporcionar as menores médias de comprimento. Vale salientar que o sucesso da técnica depende das características fisiológicas da espécie a ser conservada, devendo esta ser de crescimento lento.

Para o número e coloração das folhas, verifica-se influência significativa das fontes de carbono. Sendo este comportamento mantido ao longo do cultivo de 12 meses. As plantas desenvolvidas em sacarose apresentaram maiores número médio de folhas verdes, 8,23 e 10,45 para *A. fasciata* e *A. miniata* respectivamente, independente da concentração. Quanto ao efeito do manitol, verifica-se que para *A. fasciata* as concentrações desta fonte de carbono não influenciaram de forma significativa para este parâmetro. Quanto a *A. miniata*, as concentrações de 43,82 mM e 21,85 mM, possibilitaram maior número de folhas verdes, ratificando assim diferença no comportamento das espécies *in vitro* (Tabelas 3 e 4). Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), a sacarose é considerada a melhor fonte para a diferenciação celular e conseqüentemente desenvolvimento *in vitro* para a maioria das culturas.

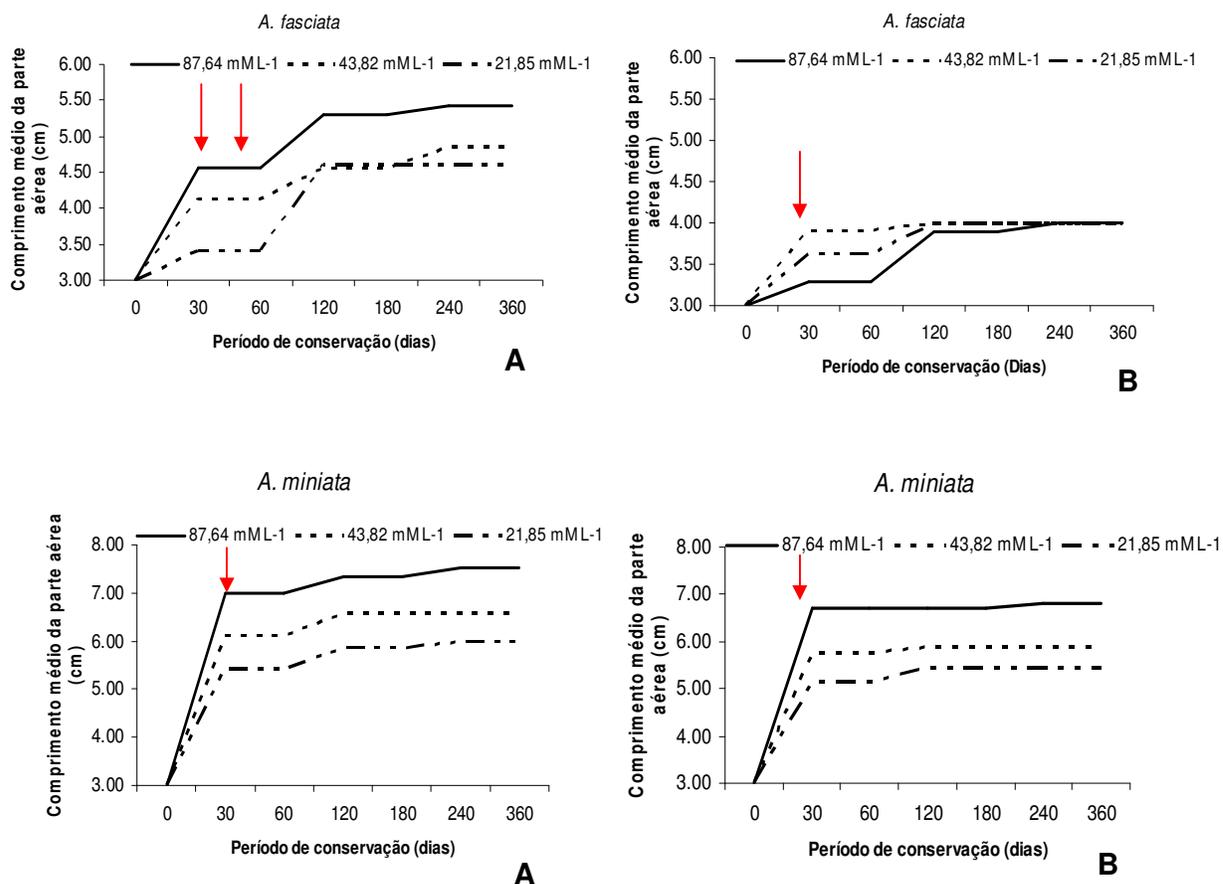


Figura 2. Incremento no comprimento da parte aérea ao longo de um ano de cultivo, em diferentes fontes e concentrações de carbono. (A) sacarose e (B) manitol.

Quanto a variável, folhas senescentes, foi observado efeito significativo entre as concentrações dentro de cada fonte de carbono. A concentração de 43,82 mM de manitol proporcionou menor número de folhas senescentes, independente da espécie. Com relação à sacarose, as concentrações de 87,64 e 43,82mM proporcionaram o menor número de folhas senescentes para a *A. miniata* e *A. fasciata* respectivamente (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Médias das variáveis número total de folhas (NTF), número médio de folhas verdes (NMFV), número médio de folhas senescentes (NMFS), de *Aechmea fasciata*, aos 12 meses de cultivo *in vitro*.

TRATAMENTOS mM L <sup>-1</sup>	NTF	NMFV (unidade)	NMFS (unidade)
87,64	14,04 a	12,7 a	1,34 b
Sacarose 43,82	7,50 b	6,75 b	0,75 c
21,85	7,41 b	5,25 c	2,16 a
<b>Média</b>	<b>9,65 A</b>	<b>8,23 A</b>	<b>1,42 A</b>
87,64	6,84 b	5,75 a	1,09 b
Manitol 43,82	6,72 b	5,75 a	0,97 c
21,85	8,36 a	6,1 a	2,26 a
<b>Média</b>	<b>7,31 B</b>	<b>5,87 B</b>	<b>1,44 A</b>
cv(%)	25,38	25,38	31,11
Teste F	*	*	*

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas dentro para cada fonte de carbono, e maiúscula entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ns não significativo.

Tabela 4. Médias das variáveis número total de folhas (NTF), número médio de folhas verdes (NMFV), número médio de folhas senescentes (NMFS), de *Aechmea miniata*, aos 12 meses de cultivo *in vitro*.

TRATAMENTOS mM L <sup>-1</sup>	NTF	NMFV (unidade)	NMFS (unidade)
87,64	18,05 a	16,4a	1,65 b
Sacarose 43,82	10,47 b	7,95 b	2,52 a
21,85	9,16 c	7,00 c	2,16 a
<b>Média</b>	<b>12,56 A</b>	<b>10,45 A</b>	<b>2,11 A</b>
87,64	7,57 b	5,5 b	2,07 a
Manitol 43,82	8,46 a	6,8 a	1,66 b
21,85	8,76 a	6,4 a	2,36 a
<b>Média</b>	<b>8,26 B</b>	<b>6,23 B</b>	<b>2,04 A</b>
cv(%)	25,38	25,38	31,11
Teste F	*	*	ns

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas dentro para cada fonte de carbono, e maiúscula entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ns não significativo.

Com relação ao efeito residual dos meios de conservação na capacidade de multiplicação dos explantes, verifica-se que os açúcares utilizados como reguladores osmóticos e fonte de carbono tiveram influência significativa nas variáveis estudadas, exceto quanto ao comprimento médio das brotações, no caso da *A. fasciata*. Avaliando a fonte de carbono sacarose observa-se que explantes provenientes do meio com 87,67 mM de sacarose apresentaram 100% da capacidade responsiva, com 3,12 brotos por explante, e comprimento médio de 1,02 cm, para a espécie *A. Fasciata* (Tabela 5). Quanto a *A. miniata*, os parâmetros apresentaram a mesma tendência, 85,5 % de explantes responsivos, 2,10 brotos por explante e comprimento médio de 1,42 cm. Quanto ao manitol as concentrações de 87,64 mM e 43,82 mM proporcionaram as maiores médias em relação as variáveis analisadas. Verifica-se também que a espécie *A. miniata*, apesar de apresentar melhor desenvolvimento nos meios de conservação, comparada a *A. fasciata*, apresentou menor capacidade responsiva, na multiplicação, após doze meses de conservação.

O crescimento na fase de recuperação do material vegetal conservado *in vitro* é o indicador de sucesso mais confiável no desenvolvimento de protocolo de conservação. Assim, mediante os resultados apresentados no estudo, as concentrações e fontes de carbono utilizadas na conservação não inviabilizaram a capacidade responsiva da cultura, apenas influenciaram na intensidade desta resposta, sendo a concentração de 21,85 mM de sacarose ou manitol a de menor eficiência.

Tabela 5. Efeito das concentrações e tipos de fonte de carbono do meio de conservação após 12 meses de cultivo *in vitro*, na regeneração *in vitro* de *A. fasciata* e *A. Miniata*.

Espécies	Meio de conservação mM. L <sup>-1</sup>	Explantos responsivos (%)	Brotos/explante (unidade)	Comprimento médio da parte aérea (cm)	
<i>A. fasciata</i>	Sacarose	87,64	100 a	3,12 a	1,02 a
		43,82	92 b	1,76 c	0,83 b
		21,85	87 c	1,85 b	0,89 b
		<b>Média</b>	<b>92 A</b>	<b>2,24 A</b>	<b>0,91 A</b>
	Manitol	87,64	100 a	2,32 a	1,11 a
		43,82	100 a	2,29 a	0,83 b
		21,85	61 b	1,47 b	0,80 b
		<b>Média</b>	<b>87 B</b>	<b>2,02 B</b>	<b>0,91 A</b>
		<b>Cv (%)</b>	35,99	26,43	13,32
		<b>Teste F</b>	*	*	ns
<i>A. miniata</i>	Sacarose	87,64	85 a	2,10 a	1,42 a
		43,82	69 b	1,11 b	0,84 b
		21,85	30 c	0,70 c	0,70 c
		<b>Média</b>	<b>61,58 A</b>	<b>1,30 A</b>	<b>0,98 A</b>
	Manitol	87,64	72 a	1,38 a	0,95 a
		43,82	61 b	1,26 b	0,91 a
		21,85	30 c	0,70 c	0,70 b
		<b>Média</b>	<b>54 B</b>	<b>1,11 B</b>	<b>0,85 B</b>
		<b>Cv (%)</b>	35,99	26,43	13,32
		<b>Teste F</b>	*	*	*

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas dentro para cada fonte de carbono, e maiúscula entre as fontes de carbono, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ns não significativo.

Quanto ao efeito do regulador vegetal, verifica-se que a maior formação de brotos por explantes, ocorreu na concentração de 17,74  $\mu\text{M. L}^{-1}$  de BAP, diferindo estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) das demais concentrações (Tabela 6), evidenciando uma taxa de multiplicação de 4,10 e 1,79 brotos/explante para *A. fasciata* e *A. miniata* respectivamente. Dosagens superiores não evidenciaram aumento na taxa de multiplicação *in vitro*. ARANDA-PERES (2005) também obteve bons resultados na regeneração de plantas das espécies *Aechmea bromelifolia* e *Aechmea distichantha* utilizando 17,74  $\mu\text{M L}^{-1}$  de BAP e 0,18  $\mu\text{M L}^{-1}$  de ANA.

ALMEIDA et al. (2002) e CANTO (2003) trabalhando com variedades de abacaxi concluíram que o BAP, em concentrações que variaram de 1,0 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>, induzem altas taxas de multiplicação. SILVA et al. (2002) observaram que a aplicação de BAP no meio de cultura para a proliferação *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. BARBOZA et al. (2004) obteve uma taxa de multiplicação de 6,4 brotos / explante quando adicionou 17,74 µM. L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultivo.

Tabela 6. Número médio de brotações, cultivadas em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP, aos 180 dias de cultivo, de *A. fasciata* e *A. miniata*.

Espécies	Concentrações de BAP (µM. L <sup>-1</sup> )				Média
	0,00	8,87	17,74	26,63	
<i>A. fasciata</i>	1,64 b A	4,10 a A	1,35b A	1,12 c A	<b>2,05 A</b>
<i>A. miniata</i>	0,99 c B	1,79 a B	1,35 b A	0,76 c B	<b>1,22 B</b>
<b>Média</b>	<b>1,32 b</b>	<b>3,03 a</b>	<b>1,35 b</b>	<b>0,94 c</b>	

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey para as concentrações e teste F para espécies a 0.05 de probabilidade.

Para a altura média dos brotos, independente do tratamento de conservação submetido, verificou-se que, o meio de cultivo sem adição de regulador vegetal, favoreceu o crescimento médio das brotações, com 1,12 e 0,94 cm para *A. fasciata* e *A. miniata*, repectivamente (Tabela 7).

Os níveis do fitorregulador empregados na fase de multiplicação de brotos, proporcionou diferentes alturas de brotos, nas duas espécies testadas neste trabalho, sendo nitidamente associada com a quantidade de BAP empregada no meio de cultura (Figura 3). Quanto maior for a quantidade de brotos na presença do BAP, menor será o tamanho. Segundo DAL VESCO (2001), níveis menores ou a ausência de citocininas promovem o crescimento/alongamento dos brotos em bromélias, especificamente *A. fasciata* e *Neoregélia carolinae*.

CANTAGALLO et al. (2005) estudando citrumelo, observaram que as variações na concentração de BAP no meio de cultura não influenciaram a altura média das brotações, o tratamento sem adição de BAP promoveu resultados superiores aos demais tratamentos. A altura média dos brotos é uma variável determinada principalmente pelo meio de cultura, concentração e tipo do regulador de crescimento (LEONTIEV-ORLOV et al., 2000; PEREZ-TORNERO e BURGOS, 2000). TANUWIDJAJA et al. (1998), verificaram que altas concentrações de citocininas no meio de cultivo promovem a formação de grande número de brotações em detrimento ao alongamento dos mesmos em abacaxi.

Tabela 7. Comprimento médio de brotos (cm) de *A. fasciata* e *A. miniata* em diferentes concentrações de BAP.

Espécies	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M. L}^{-1}$ )				Média
	0,00	8,87	17,74	26,63	
<i>A. fasciata</i>	1,12 a A	0,87 b A	0,78 c A	0,63 d A	<b>0,85 A</b>
<i>A. miniata</i>	0,94 a A	0,87 b A	0,82 c A	0,61 d A	<b>0,81 B</b>
<b>Média</b>	<b>1,03 a</b>	<b>0,87 b</b>	<b>0,80 c</b>	<b>0,62 d</b>	

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey para as concentrações e teste F para espécies a 0.05 de probabilidade.

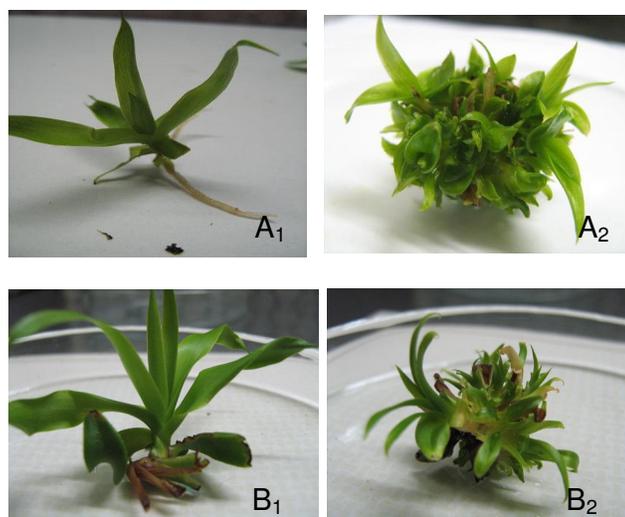


Figura 3. Aspecto morfogênico de *A. fasciata* (A) e *A. miniata* (B) em processo de regeneração no meio de cultura MS suplementado com BAP (0,0<sub>(1)</sub> e 17,74<sub>(2)</sub>  $\mu\text{M. L}^{-1}$ ).

## CONCLUSÕES

1. É possível conservar sob crescimento lento por doze meses, plantas de *A. fasciata* e *A. miniata*, em meio de cultura ½ MS suplementado com 43,82 mM de manitol, e mantidas sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  e intensidade de fluxo de fótons de  $22 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e.
2. A sacarose proporciona o maior crescimento das plantas, bem como o maior número de folhas verdes.
3. Os meios de conservação mostram efeito residual em relação à capacidade responsiva dos explantes na multiplicação *in vitro*.
4. A concentração de  $17,74 \mu\text{M.L}^{-1}$  de BAP proporciona as melhores taxas de multiplicação, independente da espécie e meio de conservação.
5. As espécies apresentaram comportamento diferenciado em relação à resposta morfogênica *in vitro*.
6. Considerando o aspecto econômico, bem como a capacidade responsiva dos explantes após doze meses de conservação, o meio mais indicado para conservar sob crescimento lento *A. fasciata* e *A. miniata* é o ½ MS suplementado com 43,82 mM manitol.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto, a CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado e a UFRB pela Pós-graduação em Ciências Agrárias, a FAPESB pelo apoio a bolsa a componentes do grupo de pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, W. A. B.; SANTANA, G. S.; RODRIGUEZ, A. P. M.; COSTA, M. A. P. C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 296-300, 2002.
- ANACLETO, A. **Cultivo de bromélias e plantas ornamentais**. EMATER-PARANÁ. Guaratuba, 2001. 18 p. Relatório técnico.
- ARAGÃO, G. **O mundo das bromélias**. São Paulo, edição 01, janeiro, 1999.
- ARANDA-PERES, A. N. **Cultivo in vitro de Bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, Avaliação nutricional e substrato para aclimação**. 2005. 125f. (Tese Doutorado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesq. Agropec. Bras.**, vol. 39, no.8, p.725-733, 2004.
- 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 biologias. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2006.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. New York: Cambridge University Press, 690 p. 2000.
- BRANDIES, M. M. **Landscaping with tropical plants**. Menlo Park (CA): Sunset, 128 p. 2004.
- BRASIL. **IBAMA**. Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. Portaria Nº 37-N, de 3 de abril de 1992.
- BSI- Bromeliad Society International. **What are Bromeliads?** Disponível em: <<http://www.bsi.org>> Acesso em: 20 jul. 2007.
- CANTAGALLO, F. S.; AZEVEDO, F. A. ; SCHINOR, E. H. ; MENDES, B. M. J. ; MOURAO FILHO, F. A. A. . Micropropagação de Citrumelo Swingle pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 136-138, 2005.
- 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 FILHO, J.L.S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A.F.; SANTOS-NETO, A.L.; AMANCIO, V.F. Produção de mudas de *Cássia grandis* L. em diferentes ambientes, recipientes e mistura de substratos. **Revista Ceres**, v. 40 , p. 341-352, 2002.

DAL VESCO, L.L.; PINTO, A.A.; ZAFFARI, G.R.; NODARI, R.O.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits**, Florianópolis, v.56, n.3, p.143-154, 2001.

DANIEL, O; VITORINO, A.C. T.; ALOVISI, A.; MAZZOCHIN, L.; TOJURA, A. M; PINHEIRO, E. R.; SOUZA. E. F. de. Aplicação de fósforo em mudas de *Acacia magnum* Will. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 21, n. 2, p.163-168, 1997.

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

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

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

FORTES, G.R. de L.; PEREIRA, J.E.S. Cultura de Tecidos. In: DANIELS, J; PEREIRA, A.S.(Eds.). *Cultivo de batata na Região Sul do Brasil*. **Embrapa Clima Temperado**. 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA / CVPH, 1990. p. 99-160.

GROSSI, F. **Aspectos da nutrição nitrogenada in vitro e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia**. Piracicaba, 2000. 116p. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Energia Nuclear. Universidade de São Paulo.

KISS, J. Ameaçadas de extinção, bromélias ganham nova vida nas estufas. **Globo Rural**. n.193. Nov/2001. Disponível em: <[http://globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/193/rep\\_bromeliaa.htm](http://globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/193/rep_bromeliaa.htm)> Acesso em: 29 nov. 2007.

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

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

LEMOS, M. de S. F.; ALENCAR, L. M. C. de; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. de. **Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R.L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.268-271, 2000.

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

MALDA, G.; SUZQAN, H.; BACKHAUS, R. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plantas possing crassulacean acid metabolism. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 81, p. 71-87, 1999.

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

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

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

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

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.

RAVEM, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. 906p.

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

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

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

SBB - SOCIEDADE BRASILEIRA DE BROMÉLIAS-SBB. **Bromélias e a natureza.** Disponível em <http://www.bromelia.org.br>. Acesso em: 13 abril 2007.

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

SCHOELLHORN, R. **Bromeliads: long-lasting tropical color.** Disponível em: <<http://hort.ifas.ufl.edu/floriculture/gpn/bromeliads.pdf>.> Acesso em: 20 Jul. 2005.

SEMA/SP. Resolução SMA 48. **Lista oficial das espécies da flora do Estado de São Paulo ameaçadas de extinção.** 2004. Disponível em: <[http://www.ibot.sp.gov.br/resolucao\\_sma48/txt\\_resolucao48.htm](http://www.ibot.sp.gov.br/resolucao_sma48/txt_resolucao48.htm)> Acesso em: 10 jul. 2007.

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

SOUZA, 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: 20 de fevereiro 2008.

STEENS, A. **Bromeliads for the contemporary gardens.** Protland: Timber, 2003. 198 p.

TANUWIDJAJA, C.; WEBB, D.T.; SAGAWA, Y. Micropropagation of *Akia Wikstroemia uva-ursi* A. Gray. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.85-90, 1998.

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

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

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

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação de recursos genéticos vegetais dos biomas tropicais é um tema de importância mundial. Enquanto muitas espécies estão em risco de extinção nas regiões temperadas, várias espécies desaparecem todos os dias nos trópicos. A proteção de espécies frente à iminente extinção é, portanto, uma questão prioritária. A conservação e o manejo da biodiversidade, mesmo em áreas protegidas nos trópicos, constituem-se em desafios complexos (Park et al., 1998).

Assim, as técnicas de conservação *in vitro* constituem-se em métodos valiosos para a conservação de recursos genéticos vegetais (Harding et al., 1997). A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratório, a partir da técnica de cultura de tecidos (George, 1993). Nestas condições, a conservação de germoplasma pode ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos. O objetivo de desacelerar o crescimento é aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, ou estendê-los indefinidamente, reduzindo-se assim a mão-de-obra e o espaço necessários para a sua conservação, além de proporcionar acesso imediato a todo o germoplasma da coleção.

As técnicas de conservação *in vitro* podem, indiscutivelmente, se constituírem em metodologias valiosas para conservação de recursos genéticos (Harding et al., 1997; Withers & Williams, 1998). Entretanto, existe o potencial risco de instabilidade genética nas culturas submetidas a estas técnicas.

O crescimento na fase de recuperação é o indicador de sucesso mais confiável na conservação *in vitro*. Apesar, das vantagens desta técnica os genótipos respondem de forma diferente. Sendo assim torna-se necessário desenvolver procedimentos específicos para cada tipo de cultura.

Para a composição de bancos de germoplasma *ex situ*, ou para estudo de qualquer natureza, portanto, devem-se retirar apenas sementes das populações. O impacto da retirada de sementes é bastante reduzido, uma vez que a grande maioria delas não chegam a germinar no campo (Cavallari 2004).

Segundo Mercier & Kerbauy (1995) o cultivo *in vitro* de sementes possibilitam a emergência da planta em um tempo mais reduzido, quando comparado ao processo natural, além de um número muito maior de sementes germinarem. Aranda-Peres & Rodriguez (2006) verificaram que sementes de *Achmea* facilmente geminaram *in vitro*.

Os resultados obtidos neste estudo revelam que a elevada disponibilidade de sementes e o percentual de germinação *in vitro* de *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Vriesea sp* e *Aechmea sp* possibilitam a propagação por meio de sementes destas espécies, bem como, a utilização dessas plantas para o estabelecimento de germoplasma *in vitro*. No caso da dificuldade de germinação, como a *Aechmea burle-marxii* e *Bromelia antiacantha* Bertoloni, apresentadas nas condições do estudo, é admissível retirar indivíduos das populações naturais, desde que indivíduos geneticamente idênticos permaneçam na população. Vale salientar que, neste caso, plantas não perfilhadas não podem ser retiradas de forma alguma do seu habitat natural. Entretanto, cada genótipo apresenta exigências próprias para germinação, havendo freqüentemente uma ação cinegética, entre vários fatores, propulsora deste processo.

A não germinação de sementes pode ser devido a diferentes fatores, que podem inclusive intensificar processos de dormência, comuns na natureza e que muitas vezes funcionam como estratégia de sobrevivência (Dias, 2005).

Quanto à conservação, verifica-se ser viável a manutenção sob condição de crescimento lento, por doze meses, plantas de *A. fasciata* e *A. miniata*, em meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS suplementado com 43,82 mM ou 21,85 mM de manitol, e mantidas sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  e intensidade de fluxo de fótons de  $22 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

O crescimento na fase de recuperação do material vegetal conservado *in vitro* é o indicador de sucesso mais confiável no desenvolvimento de protocolo de conservação. As concentrações e fontes de carbono utilizadas na conservação não inviabilizaram a capacidade responsivas da cultura, apenas influenciaram na

intensidade desta resposta, sendo a concentração de 21,85 mM de sacarose ou manitol a de menor eficiência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ A. P. M.. Bromeliad. In: ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. IV Piracicaba: Global Science Books, cap. 73, p. 644-655. 2006.

CAVALLARI, M.M **Estrutura genética de populações de Encholirium (Bromeliácea)**. Piracicaba, 2004, 106 p. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz., Universidade de São Paulo.

DIAS, D. C. F. S. Dormência em sementes: mecanismos de sobrevivência das espécies. **Revista Seed News**. n.4, 2007.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Exegetic : Edington, 1993, 547p.

HARDING, K.; BENSON, E.E.; CLACHER, K. Plant conservation biotechnology : An overview. **Agro-Food- Industry Hi-Tech**, may-june, 1997.

PARK, Y.S.; BARRETT, J.D.; BONGA, J.M. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, [s.l.], v.34, p.231-239, Jul-Sept, 1998.

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, 1998. vol 1,p.297-330.