

Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil.

Moema Cortizo Bellintani^{1,5}, Carolina Cerqueira Lima^{2,5}, Alone Lima Brito^{3,5}, José Raniera Ferreira de Santana^{4,5} e Ana Lúcia Cunha Dornelles⁶

Introdução

Orthophytum mucugense Wand. e *Neoregelia mucugensis* Leme são duas espécies da família Bromeliaceae endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil [1,2]. *N. mucugensis* ocorre no Parque Nacional da Chapada Diamantina, mas não é considerada protegida devido às extensas queimadas que atingem o Parque anualmente [1]. *O. mucugense* é a mais nova espécie de *Orthophytum* descrita. Apesar de ser encontrada em uma Unidade de Conservação e de formar grandes populações, a ocorrência restrita ao município de Mucugê – Chapada Diamantina leva a espécie à categoria vulnerável. [2]. Diante do exposto tornam-se imprescindíveis trabalhos de preservação com estas espécies.

O cultivo *in vitro* de bromélias é muito utilizado para fins comerciais, e tem ganhado espaço na preservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção [3,4]. A manutenção *in vitro* assegura o armazenamento de germoplasma e é vantajosa inclusive por proporcionar uma alta taxa de multiplicação, a produção de plantas saudáveis, e a representação de grande variedade de genótipos em espaços reduzidos [5].

A micropropagação visando a preservação de espécies deve assegurar a manutenção da variabilidade genética. Para tanto, é importante a utilização de plântulas obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes oriundas de diferentes populações [6]. Neste caso, o cultivo *in vitro* a partir de sementes é aconselhado também por gerar um grande número de plantas-matrizes, evitando a retirada de indivíduos da natureza, o que agravaria o grau de ameaça sobre estas espécies. Outra vantagem decorre da maior facilidade na desinfestação de sementes quando comparadas com tecidos extraídos de plantas nativas [7].

Estudos abrangendo a germinação de espécies de Bromeliaceae têm obtido altas taxas de germinabilidade utilizando a forma gelificada dos meios de Knudson [8] ou Murashige & Skoog [9], com sacarose e sem reguladores de crescimento. No entanto, a concentração salina destes meios pode influenciar o desenvolvimento inicial de algumas

espécies de bromélias [6,7].

As plântulas produzidas a partir da germinação *in vitro* podem ser mantidas em meio de crescimento ou utilizadas como fonte de explantes para a micropropagação. Em ambos os casos, é necessária a transferência para um meio adequado ao seu desenvolvimento. O meio Murashige & Skoog [9] tem mostrado bons resultados na propagação *in vitro* de bromélias [4,6] e o carvão ativado tem favorecido a diferenciação dos tecidos vegetais, influenciando o crescimento *in vitro* das plantas.

Visando o estabelecimento *in vitro* de *O. mucugense* e *N. mucugensis*, o presente estudo avaliou a sua germinação e crescimento em diferentes meios de cultura. Foi analisada, ainda, a influência do carvão ativado no crescimento destas espécies.

Material e métodos

A semeadura foi realizada em dois diferentes meios de cultivo: (1) meio MS [9] com metade da concentração salina, suplementado com sacarose (30g.L⁻¹) e ágar (7g.L⁻¹) ou (2) água destilada gelificada com ágar (7g.L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. A esterilização foi realizada em autoclave sob temperatura de 120°C por 15 minutos.

A germinação foi avaliada diariamente durante 78 dias após a semeadura. A semente foi considerada germinada quando houve a emissão da raiz primária.

As variáveis analisadas consistiram de: Porcentagem de Germinação (%G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (Tm) e Frequência Relativa da Germinação (Fr).

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2 (espécies x meio de cultura) com cinco repetições de 40 sementes cada.

Na avaliação do crescimento de *N. mucugensis* foram utilizadas plântulas com 15 a 30 dias, originadas a partir da germinação em ágar (7g.L⁻¹). Cada plântula foi colocada em um tubo de ensaio (25x200mm) com 15ml de meio de cultura. Foram utilizados o meio MS ou MS com metade da concentração salina (MS/2), suplementado com sacarose (30g.L⁻¹) e ágar (7g.L⁻¹) e dois níveis de carvão ativado (0 e 1,0 g.L⁻¹). O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2

1. Estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana e Professora Assistente da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências. E-mail: mcbellintani@yahoo.com.br.

2. Estudante de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

3. Estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Botânica e funcionária da Universidade Estadual de Feira de Santana.

4. Professor Adjunto da Universidade Estadual de Feira de Santana.

5. Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Horto Florestal - UEFS. Km 03, BR 116. Av. Universitária. Feira de Santana, BA. CEP 44031-460.

6. Professora Adjunto da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia da UFRRJ. BR-465, Km 7, Seropedica, RJ. CEP 23890-000.

Apoio financeiro: FAPESB.

(concentração salina x carvão) com 14 repetições de cinco plantas cada.

A avaliação do crescimento de *O. mucugense* foi realizada em duas etapas. No primeiro experimento, plântulas com 15 a 30 dias, originadas a partir da germinação em ágar (7g.L⁻¹), foram transferidas para meio MS ou MS/2, suplementado com sacarose (30g.L⁻¹) e ágar (7g.L⁻¹). Após a análise dos resultados foi montado o segundo experimento, no qual foram utilizados brotos, com 1 a 1,5cm de altura, formados *in vitro* na ausência de fitorreguladores, sendo as brotações estimuladas pela remoção do ápice de plantas estioladas. Os brotos foram inoculados em meio MS/2, suplementado com sacarose (30g.L⁻¹) e ágar (7g.L⁻¹) em dois níveis de carvão ativado (0 e 1,0 g.L⁻¹). Nos dois experimentos o material vegetal foi inoculado em tubos de ensaio com 15ml de meio de cultura. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 16 repetições de cinco plantas cada.

A avaliação do crescimento foi realizada 90 dias após a inoculação. Foram mensurados o comprimento (mm) e a massa seca (mg) da parte aérea e da raiz.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Resultados e Discussão

A germinação de *N. mucugensis* em ambos os meios foi iniciada seis dias após a inoculação das sementes e se estendeu até o 21^o (Ágar) ou 22^o (MS/2) dia depois da sementeira. Já as sementes de *O. mucugense* apresentaram uma germinação mais lenta, que se estendeu do 18^o ao 78^o dia no meio MS/2 e do 23^o ao 76^o dia no ágar.

N. mucugensis apresentou alta germinabilidade (93 – 95%) não ocorrendo diferenças significativas em relação ao tipo de meio utilizado. Já as sementes de *O. mucugense*, tiveram melhor desempenho em ágar (58,5%) que em meio MS/2 (14%), mas em ambos os tratamentos apresentaram germinabilidade significativamente mais baixa que *N. mucugensis* (Tab. 1).

Os cálculos do tempo médio e do índice de velocidade de germinação apresentaram resultados significativamente diferentes para as duas espécies, confirmando que sementes de *N. mucugensis* germinam mais rápido e em um menor intervalo de tempo que sementes de *O. mucugense*. Estes dados possibilitam ainda a observação de que o meio utilizado não influenciou nestas variáveis para nenhuma das espécies (Tab. 1).

O peso seco e o comprimento das raízes foram favorecidos pela presença de carvão nas plantas crescendo em MS. O carvão favoreceu ainda o crescimento da parte aérea de plantas cultivadas em ambos os meios (Tab. 2).

A diferença na concentração de sais do meio de cultura influenciou o comprimento da raiz. As plantas crescendo em meio MS + carvão apresentaram raízes significativamente maiores e mais pesadas que as plantas procedentes do meio MS/2 + carvão. No

entanto, na ausência de carvão, o melhor crescimento de raízes foi obtido para as plantas cultivadas em MS/2. As plantas procedentes de ambos os meios não demonstraram diferir de maneira significativa quanto ao tamanho e a incorporação de massa pela parte aérea (Tab. 2), indicando que o meio MS/2 fornece os elementos necessários para o cultivo *in vitro* de *N. mucugensis* com um menor gasto de reagentes, se comparado ao meio MS.

A análise de plantas da espécie *O. mucugense* desenvolvidas em MS e MS/2 demonstrou que a concentração de sais no meio de cultura não interferiu significativamente no seu crescimento. Por isso, optou-se por utilizar MS/2, pois o crescimento foi semelhante com custos reduzidos (Tab. 3).

Tendo estabelecido a utilização do meio de cultura MS/2 para o crescimento *in vitro* de *O. mucugense*, foi montado o segundo experimento no qual foi avaliada a influência do carvão no crescimento das plantas. A presença de carvão proporcionou um aumento de quase 88% na massa seca da parte aérea e de mais de 66% na massa seca da raiz. O comprimento da parte aérea de plantas desenvolvidas na presença de carvão sofreu um aumento de 77% e o comprimento da raiz aumentou 57% (Tab. 4). Estes resultados mostraram que a presença de carvão favoreceu o crescimento da parte aérea e também do sistema radicular de *O. mucugense*.

Foi possível verificar que plantas de ambas espécies não apresentaram diferenças significativas no crescimento quando foram cultivadas em MS ou MS/2. Portanto, os dois meios podem ser utilizados satisfatoriamente para o cultivo *in vitro* de *N. mucugensis* e *O. mucugense*.

A presença de carvão favoreceu o crescimento da parte aérea de *O. mucugense* e do sistema radicular de ambas espécies, sendo aconselhável a sua utilização em uma fase rápida, que anteceda a aclimatização, já que o desenvolvimento de raízes muito grandes pode atrapalhar a transferência e a utilização excessiva do carvão pode interferir no crescimento vegetal, por indisponibilizar elementos essenciais para o seu crescimento.

As sementes de *N. mucugensis* podem ser semeadas em ágar ou MS/2. Desta forma, germinarão já na segunda semana após a inoculação. Enquanto sementes de *O. mucugense* devem ser semeadas no ágar com ao menos quatro semanas de antecedência à utilização das plântulas.

Agradecimentos

A Maria das Graças Lapa Wanderley e sua equipe, pela identificação taxonômica das espécies estudadas e a FAPESB pelo financiamento concedido ao projeto que resultou neste trabalho.

Referências

- [1] LEME, E. M. C. 1998. *Canistropsis – Bromélias da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro: Salamandra. 143p.
- [2] WANDERLEY, M.G.L. & CONCEIÇÃO, A.A. 2006. Notas taxonômicas e uma nova espécie do gênero *Orthophytum* Beer (Bromeliaceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sítientibus Série Ciências Biológicas*, 6(1): 03-08.
- [3] CARNEIRO, L.A. & MANSUR, E. 2004. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidalia*, 2(1): 12-20.
- [4] RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L.L.; NODARI, R.O.; LISCHKA, R.W.; MÜLLER, C.V. & GUERRA, M.P. 2005. Tissue culture for

the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 14(8): 1799 - 1808.

- [5] ENGELMANN, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica*, 57: 227-243.
- [6] MERCIER, H. & NIEVOLA, C.C. 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia*, 1(1): 57-62.
- [7] MERCIER, H. & KERBAUY, G. B. 1994. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. *J. Bromeliad*, 44: 120-124.
- [8] KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-217.
- [9] MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- [10] .

Tabela 1. Valores médios para porcentagem de germinação (%G), tempo médio de germinação (TmG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis* em função do meio de cultura.

	%G ^z		TmG		IVG	
	Ágar	MS/2	Ágar	MS/2	Ágar	MS/2
<i>O. mucugense</i>	58,5 b ^W A ^V	14,0 b B	16,35 a B	18,96 a A	0,68 b A	0,13 b B
<i>N. mucugensis</i>	95,0 a A	93,0 a A	9,86 b A	10,89 b A	4,05 a A	3,57 a B

^z – Médias originais. A estatística foi realizada em médias transformadas em arco seno.

^w – Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^v – Médias seguidas pela letra maiúscula em cada linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Valores médios para peso seco da parte aérea, peso seco das raízes, comprimento da parte aérea e comprimento das raízes de plantas de *Neoregelia mucugensis* em função da concentração de sais do meio de cultura e da presença de carvão ativado.

Carvão Ativado (g.L ⁻¹)	Peso seco parte aérea (mg)		Peso seco raiz (mg)		Comprimento parte aérea (mm)		Comprimento raiz (mm)	
	MS	MS/2	MS	MS/2	MS	MS/2	MS	MS/2
0,0	8,1 b ^W A ^V	7,8 b A	2,2 b B	5,0 b A	25,6 b A	26,4 b A	11,1 b B	24,6 a A
1,0	14,5 a A ^V	11,2 a A	9,1 a A	7,6 a B	56,5 a A	48,2 a A	35,7 a A	27,6 a B

^w – Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^v – Médias seguidas pela letra maiúscula em cada linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Valores médios para peso seco da parte aérea, peso seco das raízes, comprimento da parte aérea e comprimento das raízes de plantas de *Orthophytum mucugense*, em função do meio de cultura.

Meio de cultura	Peso seco parte aérea (mg)	Peso seco raiz (mg)	Comprimento parte aérea (mm)	Comprimento raiz (mm)
MS	6,57 a ^W	1,34 a	17,46 a	23,81 a
MS/2	5,44 a	1,01 a	15,71 a	21,16 a

^w – Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Valores médios para peso seco da parte aérea, peso seco das raízes, comprimento da parte aérea e comprimento das raízes de plantas de *Orthophytum mucugense*, em função de diferentes níveis de carvão ativado no meio de cultura.

Carvão Ativado (g.L ⁻¹)	Peso seco parte aérea (mg)	Peso seco raiz (mg)	Comprimento parte aérea (mm)	Comprimento raiz (mm)
0,0	19,92 b ^W	3,68 b	28,64 b	30,47 b
1,0	37,43 a	9,81 a	50,70 a	47,93 a

^w – Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.