



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2021

APLICABILIDADE DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS NA MORFOGÊNESE INDIRETA *IN VITRO* DE BROMÉLIAS

Nathalia Ingrid Piancó Santos Lima¹; Alone Lima-Brito²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: nathpianco@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: alone@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: cultivo *in vitro*; Bromeliaceae; micropropagação.

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae, no Brasil, é formada por 56 gêneros, 1379 espécies e 110 variedades, sendo 1179 espécies endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020). Estas possuem significativo potencial ornamental, e o baixo número de plantas produzidas pela propagação natural requer estratégias para produção de plantas em escala comercial (LIMA et al., 2020).

A micropropagação via organogênese e embriogênese são utilizados para produção de microplantas e podem ser induzida por via indireta, o que aumenta a taxa proliferativa. Nesta via é necessário que haja desdiferenciação do explante, originando calo e em seguida células competentes são estabelecidas (BERTOZZO; MACHADO, 2010), e apresentam, portanto, características particulares. As análises histológicas são essenciais para determinação da rota de regeneração, permitindo distinguir entre embriogênese e organogênese (DIBAX et al., 2013) por possibilitar uma melhor visualização das características das estruturas formadas (FILIPPI et al., 2001). Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a aplicabilidade de análises histológicas em estudos de morfogênese indireta *in vitro* de bromélias.

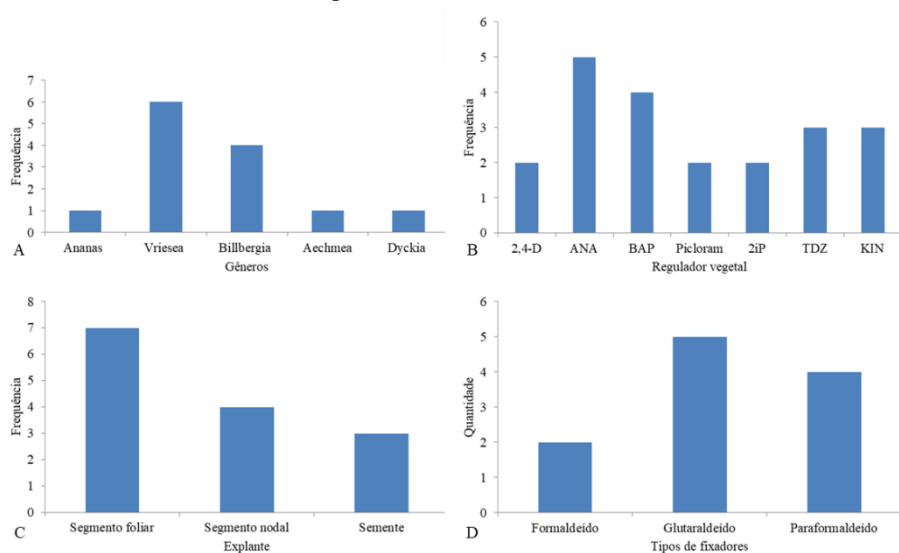
MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão sistemática a partir de publicações científicas previamente selecionadas. As bases de dados utilizadas para busca foram: Scientific Electronic Library Online (SciELO) e o Google acadêmico com as palavras-chave: “somatic embryogenesis, bromeliad, histological analysis”, e “callus, bromeliad, histological analysis”. Os critérios de inclusão consideraram apenas artigos científicos experimentais que utilizaram a via indireta e que apresentavam análise histológica de espécies de Bromeliaceae. Foram excluídos comunicações curtas, resumos, teses e dissertações, bem como os artigos que aparecerem em repetição. Os artigos pré-selecionados tiveram seus resumos lidos e foram considerados aqueles que atenderem aos critérios, em seguida foram lidos na íntegra, e realizada a extração das informações, e os resultados expressos em gráficos.

RESULTADOS

As buscas iniciais totalizaram 329 resultados, e após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão restaram 12 artigos que atendiam ao objetivo proposto neste estudo. Os artigos selecionados apresentam diferentes gêneros de Bromeliaceae, com destaque para *Vriesea* que foi objeto de estudo em 6 das 12 publicações analisadas (Figura 1A). A maioria destes trabalhos caracterizam os calos obtidos como culturas nodulares, devido à presença de estruturas em formato globular, e a partir dessas estruturas foram induzidas a formação de embriões somáticos ou brotos, caracterizando os métodos de embriogênese somática e organogênese indiretas, respectivamente, sendo que dois artigos relataram a embriogênese, três a organogênese indireta, e sete a calogênese.

Figura 1. Gêneros de Bromeliaceae (A), reguladores vegetais (B), tipos de explantes (C) e de fixadores utilizados para análise histológica (D) citados nos artigos com bromélias *in vitro*. Ácido naftaleno acético (ANA), 6-benzilaminopurina (BAP), 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), thidiazuron (TDZ), cinetina (CIN) e 2-isopenteniladenina (2-iP).



A indução dos calos, em todos os trabalhos analisados, ocorreu pelo estímulo de reguladores vegetais da classe das auxinas e das citocininas, dentre as quais o ácido naftaleno acético (ANA) e a 6-benzilaminopurina (BAP) foram os mais frequentes. Além destes, as auxinas 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e picloram também foram utilizadas, bem como as citocininas thidiazuron (TDZ), cinetina (CIN) e 2-isopenteniladenina (2-iP) (Figura 1B).

Quanto ao explante, o mais frequentemente utilizado foi o foliar, indicado em sete artigos, seguido do segmento nodal que aparece em quatro publicações e sementes em três (Figura 1C). As respostas morfogênicas dos diferentes explantes podem ser acompanhadas por análises histológicas, que permitem a visualização dos eventos morfogênicos a nível tecidual e celular de modo a elucidá-los. Desse forma, é possível descrever e comparar as características das diferentes fases de desenvolvimento e comprovar a rota regenerativa das estruturas originadas, como a via indireta para os artigos aqui estudados.

Os artigos relataram através das análises histológicas a presença de zonas meristemáticas, meristemas apicais, feixes vasculares, primórdios foliares, formação

inicial de raízes, tipos celulares e zonas dos embriões. Estas observações foram realizadas em diferentes fases da morfogênese indireta *in vitro* como a indução de calos e culturas nodulares, regeneração de brotos, microplanta, e formação de embriões somáticos. O estudo histológico permite que seja visualizado o início do processo de desdiferenciação do tecido e da proliferação celular, com presença das células iniciais do explante e células meristemáticas. Com o avanço no processo de morfogênese levando à formação de brotos, os cortes histológicos demonstram os primórdios foliares e radiculares, tecidos vasculares e auxiliam na comprovação da rota de regeneração.

Além disso, a análise histológica é de grande importância na identificação de embriões somáticos, evidenciando as estruturas embriogênicas, sua característica de bipolaridade, o estágio de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo ou cotiledonar), e ainda o sistema vascular que diferente da organogênese a qual não tem conexão com o tecido do explante inicial. Nas microplantas é possível visualizar os tecidos formados, a presença de estômatos, tricomas, o que pode ajudar a identificar características que auxiliem na etapa de transferência da microplanta para o ambiente *ex vitro*.

Observou-se também que para realização dos cortes histológicos foram seguidos métodos com uso, por exemplo, de diferentes substâncias fixadoras, nos quais as amostras a serem analisadas eram imersas, sendo a mais frequente o glutaraldeído, seguido do paraformaldeído e formaldeído (Figura 1D). Além do fixador, diferentes substâncias foram utilizadas para corar os cortes histológicos como safranina, “fast-green” e o azul de toluidina que foi a mais frequente.

Diante do observado nos estudos de morfogênese *in vitro* via indireta com espécies de Bromeliaceae, pode-se constatar a relevância dessa via para formação de microplantas por embriogênese somática ou organogênese a partir de culturas nodulares, dessa forma, constatada a viabilidade do processo, estudos complementares podem ser realizados para avaliar o potencial das culturas nodulares nos trabalhos onde esta foi a última fase alcançada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo demonstrou a importância da análise histológica na caracterização da morfogênese *in vitro* e identificação da rota regenerativa em Bromélias, bem como a carência de trabalhos sobre o tema. A morfogênese *in vitro* via indireta em bromélias pode ser obtida com a utilização de auxina e explante foliar para indução de culturas nodulares. Sugere-se avaliar o potencial das culturas nodulares que não apresentaram regeneração.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Glaise Mara; DAL VESCO, Lírio Luiz; GUERRA, Miguel Pedro. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 204-207, 2006.
- BERTOZZO, F., MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.

CORREDOR-PRADO, Jenny P. et al. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (LB Smith) LB Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 4, p. 200-209, 2015.

CORREDOR-PRADO, Jenny Paola et al. Proteomic analysis in the induction of nodular cluster cultures in the bromeliad *Vriesea reitzii* Leme and Costa. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, p. 130, 2016.

CORREDOR-PRADO, Jenny Paola et al. Proteomic identification of differentially altered proteins during regeneration from nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 2, p. 586-599, 2019.

DAL VESCO, Lirio L.; GUERRA, Miguel P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 4, p. 748-755, 2010.

DAL VESCO, Lirio L. et al. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p. 515-522, 2011.

DIBAX, Roberson et al. Protocol optimization and histological analysis of in vitro plant regeneration of RB92579 and RB93509 sugarcane cultivars. **Ciência Rural**, v. 43, p. 49-54, 2013.

FERMINO JÚNIOR, P. C. P. et al. Morfo-histologia de culturas nodulares na micropropagação de *Aechmea setigera* MART. EX SCHULT. & SCHULT. F.(BROMELIACEAE). **Evidência**, v. 14, n. 2, 2014.

FILIPPI, Silvia Balbão; Appezzato-da-gloria, beatriz; rodriguez, adriana pinheiro martinelli. variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia agricola**, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.

LIMA, Andressa Priscila Piancó Santos, Brito, Alone Lima and Santana, José Raniere Ferreira de Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. **Ciência Rural**, v. 50, n. 2, 2020.

POMPELLI, Marcelo Francisco; FERNANDES, Denise; GUERRA, Miguel Pedro. Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae)-an endangered bromeliad from South Brazil. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, n. 4, p. 192-198, 2005.

MARTINS, J. P. R. et al. Zinc and selenium as modulating factors of the anatomy and physiology of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) during in vitro culture. **Photosynthetica**, v. 58, n. 5, p. 1068-1077, 2020.

SCHERER, Ramon Felipe et al. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, 2013.

SOUZA, Thaysi Ventura et al. Morpho-and histodifferentiation of shoot regeneration of *Billbergia zebrina* (Helbert) Lindley nodular cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 127, n. 2, p. 393-403, 2016.

SOUZA, Thaysi Ventura et al. Morpho-histodifferentiation of *Billbergia Thunb.*(Bromeliaceae) nodular cultures. **Protoplasma**, v. 254, n. 1, p. 435-443, 2016.