



Crescimento *in vitro* de *Nidularium Minutum* Mez. com variações na quantidade de meio por frasco

Flávia Maria Kazue Kurita^(1,2), Camila Pereira de Carvalho^(1,2), Catarina Nievola Carvalho⁽²⁾ & Vívian Tamaki⁽²⁾

⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, flaviakurita@yahoo.com.br; ⁽²⁾ Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica

Resumo: O extrativismo ilegal das bromélias ornamentais pode levar a extinção de algumas espécies, o que é agravado quando se trata de uma espécie endêmica, como é o caso de *Nidularium minutum*. A produção de mudas pelo cultivo *in vitro* tem sido considerada estratégia para preservação de bromélias, entretanto, determinar a quantidade de meio de cultura por frasco de modo que não haja alteração do estado nutricional das plantas, torna-se fundamental para obtenção de mudas a baixo custo. O objetivo deste trabalho foi verificar a melhor quantidade de meio de cultura para o crescimento *in vitro* de *N. minutum*. Após a germinação de sementes, 60 plantas foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 20 (T1) 40 (T2) e 80 (T3) mL do meio de cultura Murashige & Skoog com a metade dos macronutrientes (MS/2). Cada tratamento tinha quatro frascos com cinco plântulas em cada, que foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, luminosidade de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 ± 2 °C, durante quatro meses. Foram analisados parâmetros biométricos da parte aérea e radicular e pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenóides). Todos os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste Tukey em nível de 5% de probabilidade. Para os parâmetros biométricos, o número de folhas foi maior em T3, porém foi neste tratamento que o comprimento da parte aérea e radicular foram menores. Em relação a quantidade de pigmentos fotossintéticos, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. A avaliação dos resultados mostrou que a utilização de 80 ml de meio de cultura foi desfavorável, pois a morfologia das plantas foi alterada neste tratamento e o mais favorável para o crescimento das plantas foi a utilização de 20 a 40 mL de meio por frasco.

Palavras-Chave: Bromeliaceae, cultura *in vitro*, preservação, propagação de plantas

INTRODUÇÃO

Sugiyama (2010) relata que a Mata Atlântica possui elevado índice de endemismo com diversas espécies ameaçadas de extinção. Dentre essas espécies está a bromélia *Nidularium minutum* Mez, endêmica da Serra de Paranapicacaba, localizada no Estado de São Paulo, região da Mata Atlântica. Essa bromélia consta como vulnerável na lista publicada no Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas de Extinção (Mamede *et al.* 2007).

Dentre as formas de preservação de espécies vegetais, o cultivo *in vitro* de bromélias tem sido considerado uma estratégia eficiente para se propagar material genético de espécies raras e ameaçadas, com a meta de assegurar a sobrevivência desse material na natureza. Porém, para se ter sucesso com esta técnica, é preciso levar em conta qual ou quais os produtos a serem desenvolvidos, escolhidos em função da demanda e dos seus preços finais, buscando-se sempre uma baixa relação custo/benefício (Stancato 2001).

Com isso, um fator relevante na redução de custos para produção de mudas *in vitro* é a utilização do volume adequado de meio de cultivo por frasco que propicie um desenvolvimento adequado das plantas micropropagadas de modo a favorecer a diminuição dos custos finais.

Neste contexto, objetivou-se determinar a menor quantidade de meio de cultivo para o crescimento *in vitro* de *N. minutum* que propiciasse um bom desenvolvimento das mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram utilizadas sementes de *Nidularium minutum* Mez. coletadas na Estação Biológica da Serra de Paranapicacaba – SP.

Crescimento in vitro

As sementes foram submetidas à desinfestação superficial em frasco contendo álcool a 70% por 5 minutos, sendo, em seguida,



imersas em solução de fungicida Benomyl 0,1% por 5 minutos e, posteriormente, colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20, durante uma hora sob agitação, quando então foram lavadas com água esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram depositadas em meio de cultura de Murashige & Skoog (1962-MS) na concentração de 50% da composição original dos macronutrientes (MS/2), mantendo-se a concentração de micronutrientes do MS, acrescidos de 3% sacarose, 0,01% mioinositol e 0,01% tiamina HCl. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 5 g/L de ágar e a sua esterilização foi realizada a 120 °C durante 15 minutos. Foram depositadas 100 sementes por placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura em cada. As placas foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, luminosidade de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$ por dois meses.

As plantas obtidas foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo diferentes quantidades de MS/2, distribuídas em três tratamentos: T1= 20 mL; T2= 40 mL e T3= 80 mL. Cada tratamento tinha quatro frascos com cinco plântulas em cada e foram mantidos em sala de cultura com as mesmas condições descritas acima, durante quatro meses.

Parâmetros avaliados

Os seguintes parâmetros biométricos foram avaliados: números de folhas e raízes, comprimentos da parte aérea e radicular, massa fresca e seca da parte aérea e radicular e pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenóides).

Os teores de clorofila e carotenóides foram analisados segundo metodologia descrita por Lichtenthaler (1987). De acordo com esse método, foram macerados cerca de 0,5 g de massa fresca de folha congelada a -20°C em 3 ml de acetona pura gelada. A amostra foi filtrada em papel, sendo o filtrado coletado em balão volumétrico de 25 mL. A acetona pura foi adicionada sobre o macerado, no papel de filtro, até atingir a brancura. O volume do balão foi completado com acetona pura para 25 mL. As absorbâncias das clorofilas foram lidas em 662 e 645 nm (clorofilas a e b, respectivamente) e a dos carotenóides, em 470 nm. A concentração dos pigmentos foi determinada de acordo com as equações definidas em Lichtenthaler (1987). A unidade utilizada foi de μg de pigmento por grama de massa fresca.

Análise estatística

As médias foram calculadas e submetidas a análise de variância, sendo comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as plantas crescidas nos frascos contendo 80 mL de meio de cultura apresentaram alterações morfológicas, como a não formação de roseta, que é presente nas plantas dos outros tratamentos (Figura 1), assim como a planta no seu ambiente natural.

Não foi possível determinar o número de raízes com exatidão, pois estas estavam agregadas, tornando difícil a separação para contagem de modo a não causar danos.

Em relação ao número de folhas, as plantas apresentaram maior quantidade no tratamento T3 (Tabela 1), como foi observado por Soares *et al.* (2008), que ao estudarem a melhor quantidade de meio de cultura (25 a 100 mL) no crescimento de duas espécies de orquídeas *Cattleya loddigesii* e *Cattleya percivaliana*, observaram que conforme aumentavam a quantidade de meio de cultura, o número de folhas, também, aumentava.

Porém em relação ao comprimento da parte aérea e radicular, os tratamentos que apresentaram plantas com os maiores valores foram o T1 e T2 (Tabela 1), mostrando que a utilização de altas quantidades de meio pode prejudicar o desenvolvimento da planta, provavelmente, devido ao pouco espaço aéreo que resta depois de colocado o meio de cultura (Moraes *et al.* 2010). Sugere-se que possa ter ocorrido um acúmulo de gases na atmosfera que ficou disponível, que de acordo com Nepomuceno *et al.* (2009), o etileno tem sido um dos principais compostos estudados, pois possui papel importante no crescimento e desenvolvimento *in vitro*.

Já em relação a massa seca da parte radicular, observou-se que as plantas crescidas em T1 foram maiores que as dos outros dois tratamentos (Figura 2), porém em relação a massa seca da parte aérea não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 2).

As análises de pigmentos fotossintéticos demonstraram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 3). Sabe-se que as clorofilas podem demonstrar o estado nitrogenado das plantas (Tamaki *et al.* 2007), com isto, este trabalho sugere que mesmo com uma menor quantidade de meio de cultura, o suprimento de nitrogênio foi suficiente para o crescimento desta espécie nesta condição.

Observa-se que os resultados do presente trabalho corroboram com os trabalhos de Santos *et al.* 2009, que para o cultivo *in vitro* da bromélia *Acanthostachys strobilacea*, utilizou frascos de 250 mL com 40 mL de meio de cultura, assim como pode ocorrer a utilização de frascos maiores, mas o volume de meio também aumenta, como Tamaki *et al.* 2007, ao estudarem o crescimento *in vitro* de *Ananas comosus* (Bromeliaceae) utilizaram frascos de 500 mL com 70 mL de meio de cultura.

CONCLUSÕES

Estes resultados sugerem que é possível cultivar *N.minutum*, uma espécie ameaçada de extinção e endêmica de Paranapiacaba, com 20 a 40 mL de meio de cultura por frasco, visto que o conteúdo de clorofila não se alterou. Com esta redução pode-se manter uma coleção *in vitro* por um tempo maior, reduzindo os gastos com a manutenção da cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Luther, H.E. 2006. An alphabetical list of bromeliad binomials. 10th ed., Bromeliad Society Internacional, Sarasota.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L. & Douce, R. (Eds). Methods in enzymology. London: Academic Press. p. 350-382.
- Mamede, M.C.H., Souza, V.C., Prado, J., Barros, F., Wanderley, M.G.L., Rando, J.G. 2007. Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo.

- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nepomuceno, C.F., Rios, A.P.S., Queiroz, S.R.O.D., Pelacani, C.R., Santana, J.R.F. 2009. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. *Revista Árvore* 33(3):481-49
- Pedroso de Moraes, C., Diogo, J.A., Canabrava, R.I., Pedro, N.P., Furtado, A.L.F.F., Marteline, M.A. 2010. Desenvolvimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lind. (Orchidaceae) em recipientes de diferentes volumes. *Revista Brasileira de Biociências* 8(2):225-228
- Santos, D.S., Tamaki, V., Nievola, C.C. 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 46 (6): 524-529.
- Stancato G.C., Bemelmans, P.F., Vegro, C.L.R. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. Campinas, 7:25-33.
- Soares, J.D.R., Rodrigues, F.A., Araujo, A.P., Pasqual, M., Assis, F.A. 2008. Crescimento *in vitro* de orquídeas: quantidade de meio e número de explantes. *Revista Ceres* 55(1): 49-53
- Sugiyama, M. 2010. Biomas do Estado de São Paulo. In Biodiversidade (V.L.R. Bononi, coord.). Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 31-49.
- Tamaki, V., Mercier, H., Nievola, C.C. 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34 (1):67-73.



Figura 1: Vista geral de *Nidularium minutum* Mez. após 4 meses nos diferentes tratamentos (T1= 20 mL; T2= 40 mL e T3= 80 mL). Barra = 1cm.

Tabela 1. Análises biométricas da parte aérea e radicular de *Nidularium minutum* Mez. cultivadas *in vitro* com diferentes quantidades de meio de cultura (T1= 20mL; T2=40 mL e T3= 80 mL). Letras diferentes na vertical indicam diferenças significativas pelo teste Tukey em nível de 5%.

Tratamento	Nº folhas	Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento da parte radicular (cm)
T1	10,1 b	7,20 a	7,00 a
T2	10,8 b	8,29 a	6,01 a
T3	20,9 a	4,15 b	2,08 b

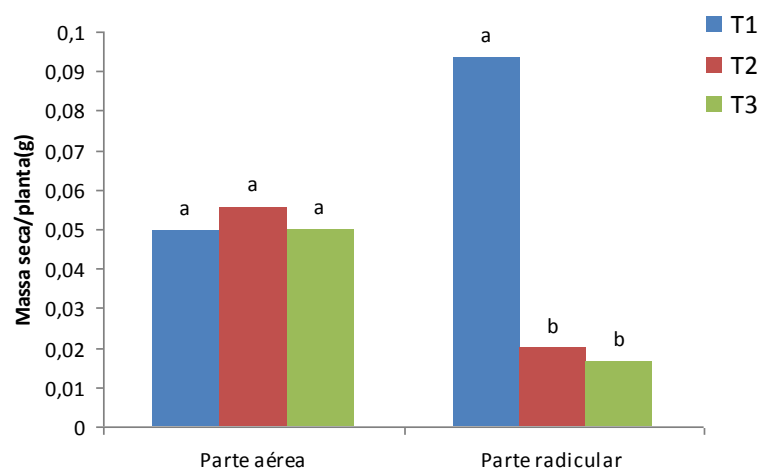


Figura 2: Massa seca da parte aérea e radicular de *Nidularium minutum* Mez. cultivadas *in vitro* em diferentes quantidades de meio de cultura (T1= 20mL; T2=40 mL e T3= 80 mL). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey em nível de 5% dentro de um mesmo parâmetro.

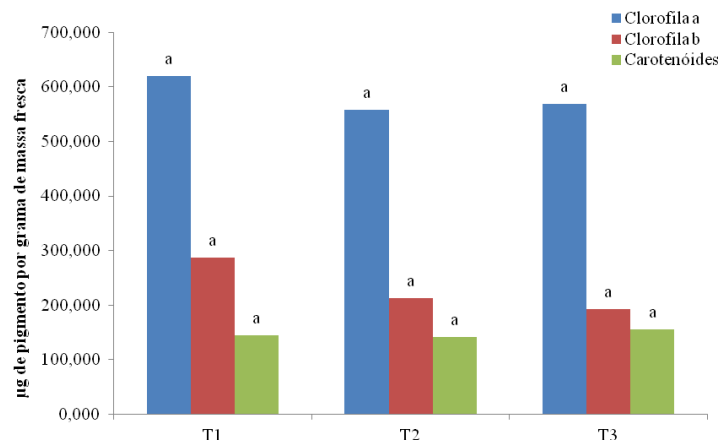


Figura 3: Quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides) em *Nidularium minutum* Mez cultivadas *in vitro* com diferentes quantidades de meio de cultura (T1= 20mL; T2=40 mL e T3= 80 mL). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey em nível de 5% para um mesmo pigmento.