

## Propagação *in vitro* da Bromélia-imperial com diferentes números de plantas e quantidades de meio nutritivo.

**Priscila Primo Andrade Silva**<sup>(1)</sup>, Rodrigo Fazani Esteves Sanches<sup>(2)</sup>, Flávia Maria Kazue Kurita<sup>(1)</sup>, Catarina Carvalho Nievola<sup>(1)</sup>, Rogério Mamoru Suzuki<sup>(3)</sup> & Vívian Tamaki<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, <sup>(2)</sup> Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Botânica, São Paulo, SP. <sup>(3)</sup> Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, São Paulo, SP. E-mail para contato: pri.primo@hotmail.com

**Resumo:** A bromélia *Alcantarea imperialis*, conhecida como bromélia-imperial, é muito utilizada na ornamentação e encontra-se em perigo de extinção. Uma das formas de se estudar e conservar uma espécie pode ser através do cultivo *in vitro*, técnica utilizada para propagação de espécies de plantas ameaçadas de extinção e que possui algumas vantagens em relação aos métodos convencionais de propagação. Contudo, para estabelecimento do cultivo *in vitro*, é necessária a escolha do meio de cultivo, quantidade de plantas e quantidade de meio nutritivo por frasco, adequado para o desenvolvimento das plantas. Objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* com diferentes números de plantas por frasco e com diferentes quantidades de meio de cultura por frasco. Para isso, sementes de *A. imperialis* desinfetadas superficialmente, foram colocadas para germinar em ágar e sacarose. Após a germinação *in vitro* as plântulas foram transferidas para frascos contendo o meio de cultura MS/2, nos diferentes tratamentos: T1-uma planta por frasco; T2 - cinco plantas por frasco; T3 - dez plantas por frasco; T4 - frascos com 20 mL de meio nutritivo; T5 - frascos com 40 mL de meio nutritivo; T6 - frascos com 80 mL de meio nutritivo, sendo que para os três últimos tratamentos foram utilizadas cinco plantas por frasco. Estas foram mantidas por quatro meses em sala de cultura sob condições controladas. Após este período foram feitas análises biométricas, de massa e de pigmentos fotossintéticos. Os resultados mostraram que o crescimento das plantas em todos os diferentes tratamentos, exceto em T4, foi satisfatório. Entretanto conclui-se que os tratamentos T3 e T5 são os mais indicados para o cultivo *in vitro* desta espécie.

**Palavras-Chave:** *Alcantarea imperialis*, Micropropagação, Nutrição.

### INTRODUÇÃO

A bromélia rupícola *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, popularmente conhecida como bromélia-imperial, é uma planta muito utilizada em paisagismo, devido às suas características ornamentais (Lorenzi & Souza, 2001). Fato que eleva a importância de estudos sobre sua propagação, visto que esta espécie encontra-se na lista da flora brasileira ameaçada de extinção na categoria “em perigo de extinção” (Martelli & Moraes, 2013).

Entre as técnicas utilizadas para propagação, estudos de espécies ameaçadas de extinção e para produção comercial de plantas, podemos citar o cultivo *in vitro* (Engelmann, 1991; Fay, 1992, 1994; Sarasam *et al.* 2006). Comparando-o com os métodos convencionais de propagação que fornecem baixo número de plantas em longos períodos de tempo e não garantem a qualidade fitossanitária destas, o cultivo *in vitro* oferece grande número de plantas em curto período de tempo garantido plantas livres de microrganismos, que eventualmente infestam a planta mãe (Mercier & Nievola, 2003; Mercier & Kerbauy, 1995).

A seleção do meio de cultura mais adequado é fundamental para estabelecimento do cultivo, uma vez que a nutrição mineral implica no crescimento e desenvolvimento das plantas (Bunn *et al.* 2011). Na maioria das vezes os meios de cultura utilizados são baseados em formulações básicas modificadas (Kanashiro, 2005). Todavia, o meio mais utilizado para o cultivo *in vitro* é o desenvolvido por Murashige & Skoog (1962-MS) (Werner *et al.* 2010).

Outro fator importante para o estabelecimento do cultivo *in vitro* é a quantidade de plantas por frascos, visto que a variação do número de plantas em um ambiente com quantidade limitada de água, nutriente e espaço, pode interferir no crescimento e desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente,

alterar os resultados finais de um estudo. Assim como a variação da quantidade de meio nutritivo nos frascos, também, pode interferir no desenvolvimento das plantas cultivadas (Caldas *et al.*, 1998, Grattapaglia & Machado, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento *in vitro* da bromélia *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms, cultivada com diferentes quantidades de plantas por frasco e o mesmo número de plantas cultivadas em diferentes quantidades de meio nutritivo por frasco.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos foram utilizadas sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, coletadas da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba.

### **Obtenção das plantas**

Cerca de 150 sementes, das quais foram retirados os apêndices plumosos manualmente (antes da germinação), foram submetidas à desinfestação superficial, com álcool a 70%, solução de fungicida Benomyl e hipoclorito de sódio a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20. Após a desinfestação, as sementes foram depositadas em placas de Petri (25 por placa) contendo 20 mL de meio de cultura 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 121°C durante 15 minutos. As placas foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, com radiação fotossinteticamente ativa de 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (PAR) e temperatura de 26±2°C por dois meses, para obtenção das plântulas.

### **Crescimento in vitro com diferentes números de plantas por frasco.**

Setenta plântulas obtidas foram transferidas para frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio nutritivo MS/2, sendo divididas em três tratamentos com diferentes números de plantas por frasco: T1= tratamento com uma planta; T2= tratamento com cinco plantas; T3= tratamento com dez plantas. Os diferentes tratamentos tiveram cada parcela experimental constituída por um frasco, com cinco repetições, as quais foram mantidas em sala de cultura sob as mesmas condições controladas descritas anteriormente, por um período de quatro meses.

### **Crescimento in vitro com diferentes quantidades de meio por frasco**

Setenta e cinco plântulas obtidas, foram divididas em outros três tratamentos com diferentes quantidades de meio nutritivo M/2 por frasco de 250 mL: T4= tratamento com 20 mL de meio nutritivo; T5= tratamento 40 mL de meio nutritivo; T6= tratamento com 80 mL de meio nutritivo, cada um dos tratamentos tiveram cada parcela experimental constituída por um frasco, contendo cinco plantas por frasco, com cinco repetições, as quais foram mantidas em sala de cultura sob as mesmas condições controladas descritas anteriormente, por um período de quatro meses.

### **Parâmetros analisados**

Após os quatro meses, foram feitas as análises dos parâmetros: números de folhas e raízes; comprimento das partes aérea e radicular; massas fresca e seca das partes aéreas e radiculares; e quantificação dos pigmentos fotossintéticos (Lichtenthaler, 1987).

### **Análise estatística**

Para as análises estatísticas as médias foram calculadas e submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Crescimento in vitro com diferentes números de plantas por frasco**

As plantas de T1 e T2 apresentaram maior quantidade de folhas em relação às plantas cultivadas em T3 (Tabela 1). Entretanto para os parâmetros, comprimentos da maior folha, massa fresca e massa seca da parte aérea, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, apenas uma tendência na redução dos valores destes parâmetros para as plantas de T3 (Tabela 1).

Fato provavelmente relacionado à maior quantidade de plantas por frasco em T3, e com isso, a consequente diminuição de nutrientes disponíveis para as plantas, podendo-se sugerir que estas plantas estavam em uma situação inicial de estresse por déficit hídrico e nutricional (Buchanan *et al.*, 2000).

Para a variável, pigmentos fotossintéticos, os valores também não demonstraram diferenças significativas (Tabela 1).

Em relação à variável número de raízes, os menores valores foram obtidos nas plantas de T3, em relação aos valores obtidos das plantas de T1 e T2 (Tabela 1), assim como os valores das variáveis, comprimento da maior raiz e massas fresca e seca

das raízes, também foram inferiores para as plantas de T3 (Tabela 1).

Esses resultados sugerem que a quantidade de nutrientes contidos nos frascos foi suficiente para o crescimento *in vitro* destas plantas, por um período de quatro meses.

#### **Crescimento in vitro com diferentes quantidades de meio por frasco**

Para as variáveis, número de folhas, comprimento da maior folha e massas fresca e seca da parte aérea, verificou-se que as plantas cultivadas em T4 foram as que apresentaram os menores valores em relação às plantas cultivadas em T5 e T6 (Tabela 1). Indicando que o crescimento e acúmulo de biomassa foram prejudicados pela baixa quantidade de meio nutritivo e consequente diminuição de água e nutrientes disponíveis para as plantas cultivadas em T4, indicando uma condição inicial de estresse por déficit nutricional (Buchanan *et al.*, 2000) nas plantas cultivadas neste tratamento.

Já os valores obtidos para a variável pigmentos fotossintéticos, não demonstraram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, apenas uma tendência na redução dos valores para as plantas dos tratamentos T5 e T6 em relação aos valores obtidos das plantas de T4 (Tabela 1).

Em relação à variável número de raízes, os menores valores foram obtidos nas plantas de T4 e T6 em relação aos valores obtidos das plantas de T5 (Tabela 1). Entretanto para variável comprimento da maior raiz, os menores valores foram obtidos das plantas cultivadas em T6 em relação às plantas crescidas em T4 e T5. Fato que já era esperado, devido ao aumento da quantidade de meio e a consequente maior disponibilidade de água e nutrientes para as plantas cultivadas neste tratamento.

Já para as variáveis massas fresca e seca radicular, não houve diferença significativa entre os tratamentos, apenas uma tendência no aumento dos valores nas plantas cultivadas em T5 (Tabela 1).

Verificou-se que as quantidades de meio nutritivo para as plantas cultivadas nos três tratamentos (T4, T5 e T6) foram suficientes para o crescimento das plantas, entretanto houve maior crescimento e acúmulo de biomassa da parte aérea nas plantas crescidas nos tratamentos T5 e T6.

#### **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos sugerem que é possível o cultivo *in vitro* de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, com dez plantas por frasco (T3), por um período de quatro meses, mesmo apresentando uma tendência na redução do seu crescimento, visto que não houve declínio no seu conteúdo de pigmentos fotossintéticos.

Em relação aos resultados do cultivo *in vitro* de *A. imperialis* com diferentes quantidades de meio MS/2 por frasco, é mais indicado o uso de 40 mL de meio M/2 (T5) para o crescimento desta espécie.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bunn, E., Turner, S. P. & Dixon, K. W.,** 2011 et al. Biotechnology for saving rare and threatened florain a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* 47: 188-200.
- Buchanan, B. B., Grissem, W. Jones, R. L.** 2000 *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Caldas, L. S., Haridasan, P. & Ferreira, M. E.** 1998. Micropropagação. *In:* C. Torres, L. S. Caldas & J. A. Buso. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* v 1. 1ed. Embrapa. pp. 87 – 132.
- Engelmann, F.** 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review 7:227-243.
- Fay, M. F.** 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular Development Biology* 28:1-4.
- Fay, M. F.** 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3: 176-183.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A.** 1998. Micropropagação. *In:* C. Torres, L. S. Caldas & J. A. Buso. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* v 1. 1ed. Embrapa. pp. 183 – 260.
- Kanashiro, S.** 2005. Nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Lichtenthaler, H.K.** 1987. Chlorophylls and Carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* 148: 350-382.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M.** 2001. Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa. Instituto Plantarium.
- Mercier, H. & Kerbauy, G. B.** 1995. The Importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana* 16: 147-149.
- Martinelli, G. & Moraes, M. A. M. (orgs.).** 2013. Livro Vermelho da Flora do Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobson: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

**Mercier, H. & Nievola, C. C.** 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1: 57-62.

**Murashige, T. & Skoog, F.** 1962 A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

**Sarasan, V., Crispps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. & Rowntree, J. K.** 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants:

progress in the past decade. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 42: 206-214.

**Werner, E. T., Milanez, C. R. D., Mengarda, L. H. G., Vendrame, W. A. & Cuzzuol, G. R. F.** 2010. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) *Acta Botânica Brasileira* 24: 1046-1051.

**Tabela 1:** Valores médios de números de folhas, comprimento da maior folha, massa fresca e massa seca da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa fresca e massa seca da parte radicular e quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenóides), para plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, após quatro meses de cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos: T1= uma planta por frasco com 40 mL de meio nutritivo MS/2; T2= cinco plantas por frasco com 40 mL de meio nutritivo MS/2; T3= dez plantas por frasco com 40 mL de meio nutritivo MS/2; T4= 20 mL de meio de cultura por frasco com cinco plantas; T5= 40 mL de meio de cultura por frasco com cinco plantas; T6= 80 mL de meio de cultura por frasco com cinco plantas.

	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<sup>1</sup> Número de folhas	11,9 a	11,5 a	09,5 b	10,1 b	11,4 a	11,1 a
<sup>1</sup> Comprimento da maior folha (cm)	6,41 a	7,04 a	5,72 a	5,33 b	6,97 a	7,07 a
<sup>1</sup> Massa fresca (g. planta <sup>-1</sup> )	0,1940 a	0,1654 a	0,1145 a	0,0760 b	0,1611 a	0,1762 a
<sup>1</sup> Massa seca (g. planta <sup>-1</sup> )	0,0179 a	0,0178 a	0,0096 a	0,0079 b	0,0135 a	0,0142 a
<sup>1</sup> Número de raízes	7,50 a	5,73 ab	4,10 b	5,20 b	6,89 a	5,80 b
<sup>1</sup> Comprimento da maior raiz (cm)	1,71 ab	2,44 a	0,95 b	2,33 a	2,16 ab	1,62 b
<sup>1</sup> Massa fresca (g. planta <sup>-1</sup> )	0,0380 a	0,0177 ab	0,0049 b	0,0173 a	0,0254 a	0,0158 a
<sup>1</sup> Massa seca (g. planta <sup>-1</sup> )	0,0042 a	0,0015 ab	0,0008 b	0,0027 a	0,0032 a	0,0011 a
<b>Pigmentos fotossintéticos</b>						
<sup>1</sup> Clorofila a (µg.g <sup>-1</sup> MF)	704,8 a	745,6 a	889,0 a	961,7 a	773,1 a	760,8 a
<sup>1</sup> Clorofila b (µg.g <sup>-1</sup> MF)	273,3 a	302,8 a	364,1 a	391,9 a	319,9 a	309,9 a
<sup>1</sup> Carotenóides (µg.g <sup>-1</sup> MF)	189,9 a	190,8 a	223,5 a	237,4 a	192,5 a	309,9 a

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.