

Avaliação do efeito do Ácido Benzilaminopurina (BAP) nos processos morfogênicos de Bromélia (*Neoregelia sp*) na multiplicação *in vitro*

Karolyne Ruela de Freitas^{1*}, Livia de Almeida Baccarin², Bruna Loerte de Moraes³, Eliane Rodrigues de Souza Mendonça⁴

¹UEG – Campus Palmeiras de Goiás. Rua S7, s/n, Setor Sul. CEP: 76190-000 (IC). <karolrfr@gmail.com>

²UEG – Campus Palmeiras de Goiás. Rua S7, s/n, Setor Sul. CEP: 76190-000 (PQ). <liviabaccarin@gmail.com>

³UEG – Campus Palmeiras de Goiás. Rua S7, s/n, Setor Sul. CEP. 76190-000 (IC).

⁴UEG – Campus Palmeiras de Goiás. Rua S7, s/n, Setor Sul. CEP. 76190-000 (IC).

Resumo: As bromélias são plantas herbáceas, presentes em ampla variedade na natureza, com cores, formas e arquiteturas que chamam a atenção dos consumidores do Brasil e do mundo inteiro. Em busca de um protocolo de multiplicação eficiente da espécie, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta morfogênica de *Neoregelia sp* desenvolvida *in vitro* às concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). As plântulas coletadas do jardim clonal, foram transferidas para o meio de cultura básico suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) e constituindo os tratamentos, com zero, 0,025 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹ e 0,1mg.L⁻¹ de BAP. Após quatro subcultivos (120 dias) as microcepas foram pesadas individualmente e separadas para avaliação das variáveis. O tratamento com concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP obteve as melhores médias para número de gemas, número de raízes, peso da matéria fresca e da matéria seca, porém, mesmo se destacando perante os demais tratamentos, não diferiu estatisticamente da testemunha na variável número de gemas. A testemunha apresentou maior tamanho nas cepas. O uso de BAP no cultivo *in vitro* é muito eficaz na promoção da multiplicação da parte aérea em diversas espécies, gerando desempenho satisfatório para a massa de matéria fresca das microplantas.

Palavras-chave: Bromeliaceae. Micropropagação. Regulador de crescimento.



Introdução

Segundo Correia et al., (1999), as bromélias são oriundas de climas tropicais e subtropicais das Américas. A Família Bromeliácea apresenta cerca de 50 gêneros e aproximadamente 4.000 espécies, sendo 40% nativas do Brasil. Um dos gêneros mais conhecido e comercializado é o *Ananas Lucidus*, um abacaxi ornamental. Conforme Tamaki et al., (2011) “A grande maioria dos representantes de Bromeliaceae é considerada ornamental, devido à arquitetura foliar em roseta e brácteas geralmente coloridas.” Desta maneira, as bromélias ganharam espaço no mercado por despertar o interesse ornamental, uma vez que a espécie é dotada de uma diversidade interessante de formas e cores, e com isto acabam gerando volume comercial significativo (SILVA, 2011).

As bromélias são plantas herbáceas de folhas largas ou estreitas, lisas ou serrilhadas, com e sem espinhos, de cores variadas, desde o verde ao vinho, variegadas, com e sem manchas, listras e/ou pintas, sendo uma espécie que apresenta uma ampla variedade na natureza, de cores, formas e arquiteturas que chamam a atenção dos consumidores do Brasil e do mundo inteiro (CARNEIRO, 2004). Porém, o processo de propagação natural da espécie é muito lento, o que dificulta sua produção em larga escala.

A velocidade de germinação quando comparadas ao processo ocorrido em ambiente natural está entre a principal vantagem do cultivo *in vitro*. A germinação de bromélias *in vitro* tem sido relatada na literatura com resultados diferenciados para as espécies, no Brasil podem ser encontrados mais de 70% do gênero Bromeliácea catalogada (TAMAKI, 2011).

“Se bem utilizada, a cultura de tecidos pode ser uma alternativa viável para aumentar o número de plantas por ano com a mesma característica genética, independente da época do ano e em menor espaço de tempo” (CORREIA et al. 1999).

Neste contexto o presente trabalho visa avaliar a resposta morfogênica da bromélia desenvolvida *in vitro* às concentrações de BAP, verificando assim qual a melhor concentração para o desenvolvimento e multiplicação da mesma.

REALIZAÇÃO



Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Estadual de Goiás, localizada no município de Palmeiras de Goiás, nas coordenadas geográficas 16° 48' 18"S 49° 55' 33" W, com altitude média de 596 m.

O trabalho foi conduzido a partir de brotações obtidas de microcepas de *Neoregelia* sp cedidas pelo Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP.

Para o estabelecimento do micro jardim clonal, plântulas germinadas *in vitro* em meio de cultura constituído por sais de Murashige e Skoog (1962) acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹), mio-inositol (100 mg.L⁻¹), tiamina (0,10 mg.L⁻¹), sem o acréscimo de reguladores de crescimento (meio básico), foram coletadas e transferidas para o mesmo meio de cultura básico suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de ANA e constituindo os tratamentos, com zero, 0,025 mg.L⁻¹, 0,05 mg.L⁻¹ e 0,1mg.L⁻¹ de BAP.

Após quatro subcultivos (120 dias) as microcepas foram individualmente separadas para avaliação do peso da matéria fresca, e então, armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em estufa a 60° C até obtenção de peso constante para a avaliação do peso da matéria seca e da taxa de crescimento relativo.

O material vegetal foi mantido em temperatura ambiente, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 36 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em meio de cultura líquido, pH ajustado a 5,8 e autoclavados por 30 min a 121 °C.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado testando-se quatro concentrações de BAP, sendo a concentração 0,05 mg.L⁻¹ a testemunha (concentração recomendada à espécie), usando dez repetições com cinco explantes por repetição.

Os dados mensurados na avaliação após os 4 subcultivos foram submetidos ao teste de Tukey (P<0,05), em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA, P<0,05). O software Sisvar 5.6 foi utilizado na análise de variância.

Resultados e Discussão

REALIZAÇÃO

Alguns autores ressaltam a relevância do cultivo *in vitro* e os diversos protocolos com formulações de meios básicos suplementados com concentrações e/ou combinações de reguladores vegetais. A utilização destes nos meios de cultura, objetivam adequá-los às necessidades de cada espécie, buscando obter melhor crescimento, alongamento, enraizamento e multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1999; BARBOZA et al., 2004; SILVA et al., 2008). Em conformidade com os autores acima, Tagliacozzo (1998) demonstra que nestes protocolos, a adição de reguladores vegetais tem a missão de suprir as deficiências dos teores endógenos destes nos explantes isolados da planta matriz. Lembrando que a concentração e o tipo de regulador vegetal devem estar diretamente relacionados com o tecido utilizado como explante e da espécie vegetal. No presente trabalho os efeitos da adição de auxina e citocinina podem ser visualizados na Figura 1.

Figura 1 – Plântulas de *Neoregelia* sp, após 120 dias de cultivo. A) meio MS contendo $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, tratamento 2 (miçanga rosa). B) meio MS contendo $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, testemunha (miçanga azul claro). C) meio MS contendo $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, tratamento 1 (miçanga amarela). D) meio MS sem adição de BAP, tratamento 3 (sem miçanga).



Os resultados encontrados para o número de gemas são apresentados na tabela 1 e observa-se que o tratamento com concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (T1), obteve o maior índice de número de gemas, diferindo estatisticamente do tratamento sem adição de BAP (T3). O T1 apresentou melhores médias, embora não tenha apresentado diferença estatística em relação a testemunha e o T2 ($0,025$



mg.L⁻¹ de BAP). Isso provavelmente se explica pois as citocininas são indispensáveis na proliferação de gemas axilares, sendo os tipos e níveis os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro* (BRONDANI et al., 2009) e a alta concentração de BAP induziu significativamente tal proliferação nas cepas avaliadas.

Tabela 1 – Resultado da análise de variância para o número de gemas de plântulas de *Neoregelia sp* em meio MS contendo 0,1 mg.L⁻¹ de BAP (T1), 0,025 mg.L⁻¹ de BAP (T2), ausência de BAP (T3) e a concentração ideal de 0,05 mg.L⁻¹ de BAP e 0,05 mg.L⁻¹ de ANA (Testemunha), após 4 subcultivos sucessivos, com duração de 21 dias cada

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T3	1.166667	a1
Testemunha	1.833333	a1 a2
T2	1.833333	a1 a2
T1	2.500000	a2

Vicente et al. (2009), trabalhando com *Vernonia condensata*, constataram que a concentração de 0,1 mg L⁻¹ de BAP foi a que proporcionou a melhor resposta em relação ao número de brotos por explantes. Brum et al. (2002) demonstraram que o efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode estar relacionado com a influência desse regulador na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical.

O mesmo comportamento pode ser observado para o número de raízes, peso fresco e peso seco (Tabelas 2 e 3), onde o T1 apresentou as melhores médias, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Tabela 2 - Resultado da análise de variância para o número de raízes das plântulas de *Neoregelia sp* em meio MS contendo BAP (T1 e T2), ausência do BAP (T3) e a

concentração ideal contendo 0,05 mg.L⁻¹ de BAP e 0,05 mg.L⁻¹ de ANA (Testemunha), após 4 subcultivos sucessivos, com duração de 21 dias cada.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T3	2.333333	a1
Testemunha	3.166667	a1
T2	3.666667	a1
T1	7.333333	a2

Tabela 3 – Resultados da análise de variância para os valores de peso fresco e peso seco das plântulas de *Neoregelia sp.*

Tratamentos	Peso Fresco Médias	Peso seco Médias
Testemunha	0.299350 a1	0.102800 a1
T2	0.427867 a1	0.161400 a2
T3	0.448483 a1	0.194100 a3
T1	0.801233 a2	0.262600 a4

O T3 (ausência de BAP), obteve menor valor na variável número de raízes. A testemunha nas variáveis peso fresco e seco, apresentou as menores médias. O uso de BAP tem sido eficaz para promover a multiplicação da parte aérea em diversas espécies (FRÁGUAS et al., 2009). Isso se deve principalmente por induzir a divisão celular com células de tamanho reduzido (PEREIRA et al., 2000), o que propicia a formação de uma maior massa seca.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados para tamanho das cepas e observou-se que a testemunha apresentou os melhores resultados, diferindo estatisticamente do T1 (0,1 mg.L⁻¹ de BAP) e T2 (0,025 mg.L⁻¹ de BAP), embora não tenha apresentado diferenças estatísticas com relação ao T3 (ausência de BAP). O T1 detém da maior concentração de BAP dentre os tratamentos e obteve um dos menores valores para esta variável.

Tabela 4 – Resultado da análise de variância para o tamanho das cepas das plântulas de *Neoregelia sp* em meio MS contendo BAP (T1 e T2), ausência do BAP

(T3) e a concentração ideal contendo 0,05 mg.L⁻¹ de BAP e 0,05 mg.L⁻¹ de ANA (Testemunha), após 4 subcultivos sucessivos, com duração de 21 dias cada.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	1.565000	a1
T2	2.095000	a1 a2
T3	2.450000	a2
Testemunha	2.451667	a2

O uso de BAP pode apresentar efeito fitotóxico, que é caracterizado principalmente pela falta de alongamento, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós e engrossamento exagerado dos caules (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Essa redução de tamanho da parte aérea é comumente observada, porque o BAP é um regulador que induz à divisão celular reduzindo o tamanho das células e aumentando o número destas (PEREIRA et al., 2000).

Durante o experimento houve uma grande perda de material cultivado, devido uma contaminação por diferentes tipos de fungos dentro do laboratório da Universidade, onde mais de 15 repetições foram perdidas (Figura 2). Para controlar a infestação foi realizada uma desinfecção total do laboratório com hipoclorito de sódio e Lysoform (cloreto de benzil alquil dimetil amônio - 0,4%) .

Figura 2 – Plântulas de *Neoregelia sp* contaminadas com fungo.



No presente estudo, os efeitos observados foram satisfatórios para o uso do regulador vegetal BAP, onde os resultados indicam o potencial e a influência desse regulador no crescimento de plântulas da espécie *Neoregelia sp*.



Considerações Finais

Considerando os resultados observados no presente trabalho, pode-se concluir que a concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP com 0,05 mg.L⁻¹ de ANA (T1), obteve os melhores resultados na maioria dos parâmetros avaliados, em comparação aos demais tratamentos.

A alta concentração de BAP do tratamento 1, com 0,1 mg.L⁻¹ propiciou maior multiplicação, porém menor alongamento e produção de biomassa às microplantas de *Neoregelia* sp.

A testemunha apresentou maior tamanho nas cepas, propiciando cepas em torno de 4,8 cm e excelente índice de multiplicação das gemas laterais.

Referências

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 37-64.

CALDERAN, E. Avaliação morfofisiológica, histológica e histoquímica das vias morfogênicas na micropropagação de *Neoregelia* SP. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Universidade de São Paulo, 2015.

CARNEIRO, L. A. & MANSUR, E. Contribuição de metodologias in vitro para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, Viçosa, v.2, n.1, p.12-20, 2004.

CORREIA, Diva et al. **Avaliação da multiplicação in vitro do abacaxi ornamental** (*Ananas lucidus* Miller). Embrapa Agroindústria Tropical, 1999. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/422628/1/Pa056.pdf>
Acesso em: 26 de Março de 2017.

REALIZAÇÃO



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.

ENDRES, L.; MERCIER, H. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 1, p. 29-42, 2001

HUSSAIN, A.; QARSHI, I.A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A.; RINALDI, L.M.R. **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. 2012

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 13 edition. Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota. 114p. 2012

MATHEWS, V. H.; RAO, P. S. In vitro plant regeneration in lateral bud explants of *Cryptanthus bromelioides* var. *tricolor* M. B. Foster. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 1, p. 108-110, 1992.

MEKERS; O. In vitro propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Acta Horticulturae**, The Hague, v.78, p. 311-317, 1977.

MENGARDA, L.H.G.; POVOAS, L.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.6, p.469-474, 2009.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p. 247-249, 1992.

PARDO, A.; MICHELANGELI, C.; MOGOLLÓN, N.; ALVARADO, G. Regeneración *in vitro* de *Billbergia Rosea* Hortus Ex Beer a partir de ápices caulinares. **Boletín Del Centro De Investigaciones Biológicas**, Maracaibo, v. 42, n. 4, p. 491–505, 2008.



SCHERER, R.F.; GARCIA, A. C.; FRAGA, H.P.F.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.A.; GUERRA, M.P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.151, p.38-45, 2013.

SILVA, Sônia Maria Gonçalves. **Reguladores vegetais no desenvolvimento in vitro de bromélia** (*Aechmea blanchetiana*). p. 1-58, 2011. Disponível em: http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/93584/silva_smg_me_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y Acesso em: 27 de Março de 2017.

TAMAKI, Vívian, et al. "Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais." **O Mundo da Saúde** 35.1 (2011): 91-97. Disponível em: http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/83/91a97.pdf Acesso em: 25 de Março de 2017.

WENDT, T. 1999. **Hibridização e isolamento reprodutivo em *Pitcairnia* (Bromeliaceae)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 141p., 1999.