



Determinação da concentração salina e vitamínica adequada ao cultivo *in vitro* de Bromélia (*Neoregelia* sp).

Bruna Loerte de Moraes ^{1*}, Livia de Almeida Baccarin ², Karolyne Ruela de Freitas³

^{1*}Universidade Estadual de Goiás – UEG. Rua S7, Qd 1A - s/n, 76190-000, Palmeiras de Goiás – GO. (IC) brunaloerte33@gmail.com

²Universidade Estadual de Goiás – UEG. Rua S7, Qd 1A - s/n, 76190-000, Palmeiras de Goiás – GO. (PQ). liviabaccarin@gmail.com

³Universidade Estadual de Goiás – UEG. Rua S7, Qd 1A - s/n, 76190-000, Palmeiras de Goiás – GO. (IC) karolrfr@gmail.com

Resumo: As bromélias possuem grande importância no mercado de ornamentais, sendo utilizadas para projetos paisagísticos, porém sua propagação natural é lenta. A cultura de tecidos, permite a multiplicação em larga escala de genótipos de interesse comercial. A produção maciça de mudas de bromélias reduz o interesse extrativista nesta, colaborando com sua recuperação na natureza. Nesse contexto objetivou-se avaliar o desenvolvimento de plântulas de bromélia do gênero *Neoregelia* sp cultivadas *in vitro* a partir do uso quatro concentrações do meio de cultura MS, para determinar a melhor constituição salina e vitamínica para seu desenvolvimento. As brotações de microcepas obtidas do microjardim clonal, foram transferidas para quatro tratamentos com composições do meio de cultura MS (2X, ½X, ¼X e MS completo (testemunha)), todos suplementados com 0,50 mg.L⁻¹ ácido naftaleno acético (ANA) e 0,50 mg.L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP). As microcepas foram mantidas por 120 dias em temperatura ambiente, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 36 µmol.m⁻².s⁻¹ e então submetidas a diversas análises morfofisiológicas. De acordo com as variáveis analisadas foi possível observar que as baixas concentrações nutricionais testadas para a espécie *Neoregelia* sp (½X e ¼X da composição do MS), inibiram o acúmulo de biomassa e o alongamento das brotações laterais nas microcepas.

Palavra-chave: Protocolo de desenvolvimento. Meios de cultura. Organogênese.



Introdução

As bromélias são monocotiledôneas encontradas em diversas condições de altitude, temperatura e umidade. Podem ser classificadas na natureza como plantas epífitas terrestres ou rupícolas e compõem um grupo de plantas que apresentam uma grande resistência para sobreviver em condições adversas além de apresentarem variadas formas, cores, tamanho e arquiteturas que encantam consumidores de todo o mundo (CARNEIRO, 2004). Possuem grande importância no mercado interno e externo de ornamentais, sendo muito utilizadas para projetos paisagísticos (SILVA, 2011), porém sua propagação natural é muito lenta. Em função da grande procura e da baixa produtividade natural das espécies, o extrativismo de seus ambientes naturais coloca algumas em maior risco e ameaça a extinção.

A cultura de tecidos tem como principal vantagem permitir a conservação do germoplasma além da multiplicação em larga escala de genótipos de interesse comercial, como é o caso, o que certamente reduziria o interesse extrativista nestas espécies, colaborando com sua recuperação na natureza e a diminuição do tempo de produção das mudas.

O meio de cultura usado na técnica de cultura de tecidos fornece as substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, portanto, os meios de cultura existentes se baseiam nas exigências nutricionais da planta como um todo, considerando que algumas modificações são necessárias para atender às necessidades da técnica *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Apesar de existirem diversos trabalhos sobre a adequação de meios de cultura, a maior parte tem como objetivo estudos sobre o tipo e concentração dos reguladores de crescimento, carecendo estudos relacionados à formulação nutricional *in vitro* (ENDRES, MERCIER, 2001). A organogênese adventícia é o processo de indução à formação de um novo órgão na planta, seja este pelo desenvolvimento de uma gema, raízes adventícias ou folhas e a constituição salina e vitamínica do meio é de extrema importância para sua ocorrência.

REALIZAÇÃO





Nesse contexto, objetivou-se neste trabalho, avaliar o desenvolvimento de plântulas de bromélia do gênero *Neoregelia* sp cultivadas *in vitro* a partir do uso quatro composições do meio de cultura Murashige e Skoog (1962).

Material e Métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UEG Campus Palmeiras de Goiás, GO. O trabalho foi realizado 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 ($0,10 \text{ mg.L}^{-1}$), sem o acréscimo de reguladores de crescimento (meio básico), foram coletadas e transferidas para quatro tratamentos com composição salina e vitamínica diferentes, sendo estes constituídos por: 2x MS (meio MS com o dobro dos sais e vitaminas), $\frac{1}{2}$ MS (meio MS com metade da concentração de sais e vitaminas) e $\frac{1}{4}$ MS (meio MS com um quarto da concentração de sais e vitaminas), meio MS completo, como testemunha, todos acrescidos de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA,. O material vegetal foi mantido à 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 (DIC), contendo dez repetições com três cepas por repetição.

O cultivo teve duração de 120 dias, com subcultivos a cada 21 dias para renovação do meio de cultura. Após os quatro subcultivos foram feitas as seguintes avaliações: peso da matéria fresca, tamanho da cepa, número de raízes, número de gemas e peso da matéria seca.



Resultados e Discussão

Os principais componentes de um meio de cultura são: água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, porém, segundo Ramage e Williams (2002), pouca atenção é dada aos efeitos nutricionais durante o desenvolvimento vegetal *in vitro*.

No primeiro ensaio de avaliações foi realizada a análise de peso de matéria fresca, onde a quantidade de biomassa apresentou valor significativamente inferior apenas para o tratamento três, contendo $\frac{1}{4}$ de meio. Mesmo não deferindo estatisticamente, o tratamento quatro, testemunha, apresentou melhor média, quando comparado aos demais (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios da análise de variância do peso fresco de explantes de *Neoregelia* sp em meio MS contendo 2X a quantidade de meio MS (T1), $\frac{1}{2}$ de meio MS (T2), $\frac{1}{4}$ de meio MS (T3) e testemunha (T4), ao longo de 4 subcultivos sucessivos.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T3	0.158000	a1
T2	0.373333	a2
T1	0.395000	a2
T4	0.450167	a2

O baixo acúmulo de biomassa no tratamento 3, provavelmente se justifica pela baixa concentração mineral em sua constituição, dificultando assim a assimilação dos nutrientes essenciais aos processos bioquímicos necessários ao desenvolvimento do vegetal.

No segundo ensaio de avaliações, observou-se que, na variável número médio de raízes, os tratamentos um (2x meio MS) dois ($\frac{1}{2}$ meio MS) e três ($\frac{1}{4}$ meio MS) não apresentaram diferença significativa entre si, porém a testemunha foi estatisticamente superior a todos, até mesmo ao T1, onde apresentou semelhança significativa. Pode-se então afirmar que a testemunha obteve maior número de raízes em relação a todos os tratamentos testados (Tabela 2).

REALIZAÇÃO





Tabela 2- Valores médios da análise de variância do número de raízes de explantes de *Neoregelia* sp em meio MS contendo 2X a quantidade de meio MS (T1), $\frac{1}{2}$ de meio MS (T2), $\frac{1}{4}$ de meio MS (T3) e testemunha (T4), ao longo de 4 subcultivos sucessivos.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T3	1.166667	a1
T2	1.166667	a1
T1	2.000000	a1 a2
T4	2.333333	a2

Os níveis de auxina são os fatores que possuem maior influência em relação ao enraizamento e aumento de biomassa de espécies de plantas trabalhadas *in vitro*, outros componentes do meio de cultura sejam frequentemente modificados visando melhor promoção do enraizamento (KHAN et al., 2004). Portanto, na avaliação da variável enraizamento neste trabalho pode-se dizer que a falta de disponibilidade de nutrientes, como no T3, impediu o desenvolvimento e a indução da raízes adventícias.

Em relação à avaliação do número de gemas, os tratamentos não apresentaram diferença estatística, no entanto, o tratamento que mais se destacou, com melhor média, foi a testemunha, T4. Isso provavelmente se explica pela presença dos reguladores de crescimento, ANA e BAP, presentes em todos os tratamentos e em mesma concentração. A relação auxina citocinina nos vegetais é de extrema importância para a indução e multiplicação de gemas laterais nos vegetais. Como se encontram iguais em todos os tratamentos, tal indução fora estimulada em mesma intensidade.



Tabela 3- Valores médios da análise de variância do numero de gemas de explantes de *Neoregelia* sp em meio MS contendo 2X a quantidade de meio MS (T1), $\frac{1}{2}$ de meio MS (T2), $\frac{1}{4}$ de meio MS (T3) e testemunha (T4), ao longo de 4 subcultivos sucessivos.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T3	1.166667	a1
T2	1.333333	a1
T1	1.333333	a1
T4	1.833333	a1

As citocininas influenciam no desenvolvimento dos cloroplastos, na regulação do crescimento dos caules e raízes além de induzirem a proliferação de gemas axilares (TAIZ E ZEIGER, 2009). As auxinas também possuem papel importante pois são essenciais para promover o crescimento meristemático e a extremidade do broto dos explantes.

Para a avaliação do tamanho da cepa, o tratamento dois ($\frac{1}{2}$ de meio) foi inferior estatisticamente quando comparado aos demais. Já o tratamento três ($\frac{1}{4}$ de meio), foi estatisticamente semelhante tanto ao menor resultado (T2) quanto aos maiores resultados (T1 e T4), que obtiveram valores significativos entre si, como mostra a tabela 4. Tal fato ocorreu, possivelmente, porque baixas concentrações nutricionais inibiram o desenvolvimento morfogênico das brotações laterais, não ocorrendo o alongamento das mesmas.

Tabela 4- Valores médios da análise de variância do tamanho da cepa de explantes de *Neoregelia* sp em meio MS contendo 2X a quantidade de meio MS (T1), $\frac{1}{2}$ de meio MS (T2), $\frac{1}{4}$ de meio MS (T3) e testemunha (T4), ao longo de 4 subcultivos sucessivos.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T2	1.818333	a1
T3	2.111667	a1 a2
T1	2.371667	a2
T4	2.448333	a2

A avaliação da variável peso de matéria seca, não pôde ser discutida nos resultados devida a perda total do material, em consequência de um aumento irregular da temperatura da estufa, chegando a temperaturas maiores que 100°C, queimando todo o material existente para avaliação.

Durante o trabalho foi possível observar que as microcepas de *Neoregelia* sp (exceto a testemunha) após 90 dias de cultivo, apresentaram redução na biomassa e na formação de brotações impedindo seu desenvolvimento, como pode ser observado na figura 1. Esse fator pode ser justificado devido ao excesso ou diminuição da disponibilidade de sais e vitaminas para seu metabolismo, ou em consequência das altas temperaturas ambiente às quais as microplantas foram submetidas.

Figura 1- Microcepas de explantes de *Neoregelia* sp em meio MS contendo 2X a quantidade de meio MS (T1), $\frac{1}{2}$ de meio MS (T2), $\frac{1}{4}$ de meio MS (T3) e testemunha (T4), ao longo de 3 subcultivos sucessivos.



Segundo Williams (1991), a absorção dos nutrientes minerais por plantas cultivadas *in vitro* pode ser afetada por fatores como a composição do meio de cultura, composição do tecido da planta além do ambiente de cultivo. O comportamento das plantas é susceptível às variações ambientais, como a

temperatura e luminosidade, o que impõem uma série de desafios à sua sobrevivência.

Um grave problema enfrentado durante a realização do experimento foi uma contaminação por diferentes tipos de fungos presentes no laboratório (Figura 2), o qual resultou em uma grande perda, onde mais de 15 repetições foram perdidas. Para controle da infestação, foi realizada uma limpeza total do laboratório com o uso de hipoclorito de sódio e cloreto de alquil de metil benzil amônio - 0,4%.

Figura 2 - Microcepas de explantes de *Neoregelia* sp em meio MS, contaminadas com fungos.



Considerações Finais

Com este trabalho foi possível observar que as baixas concentrações nutricionais testadas para a espécie *Neoregelia* sp ($\frac{1}{2}X$ e $\frac{1}{4}X$ da composição do MS), inibiram o acúmulo de biomassa e o alongamento das brotações laterais nas microcepas.

Em relação ao tratamento 1 (2x a composição do MS), as variáveis apresentaram boas médias quando comparadas a testemunha, esse fato pode ser justificado pois os nutrientes disponíveis às microplantas no meio MS completo e no dobro de sua composição salina e vitamínica são equivalentes, suprimindo às microplantas para o melhor desenvolvimento fisiológico.



Porém a partir do segundo subcultivo houve uma redução no tamanho e número das gemas e das raízes expostas ao tratamento 1 (2x a composição do MS), lhe trazendo características fitotóxicas para a continuidade de produção.

Agradecimentos

A Deus por me iluminar com sabedoria e força, para concluir mais um trabalho com sucesso;
A Prof.^a M.Sc. Livia de Almeida Baccarin, minha orientadora, pela paciência e dedicação ao longo do trabalho além de todo conhecimento transmitido; Ao responsável pelo laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, Breiner Gabriel Canedo Silva por sempre se dispor a me ajudar.

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.

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.

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.

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

SILVA, Sônia Maria Gonçalves. **Reguladores vegetais no desenvolvimento in vitro de bromélia** (Aechmea blanchetiana). p. 1-58, 2011.

KHAN, S.; NASIB, A.; SAEED, B.A. Employment of in vitro technology for large scale multiplication of pineapples (Ananas comosus). **Pakistan Journal of Botany**, v.36, n.3, p.611- 615, 2004.



V Congresso de Ensino,
Pesquisa e Extensão da UEG



TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4. ed. Porto Alegre:Artmed, 2009. 820 p.

WILLIAMS. R.R. Factors determining mineral uptake in vitro. **Acta Horticulture**, n. 289, p. 165-169, 1991.

REALIZAÇÃO

PRG
Pró-Reitoria de
Graduação

PRP
Pró-Reitoria de
Pesquisa e
Pós-Graduação

PRE
Pró-Reitoria de
Extensão, Cultura e
Assuntos Estudantis



Universidade
Estadual de Goiás