

Micropropagação de *Aechmea tocantina* Baker (Bromeliaceae)

Fernanda de Paula Ribeiro Fernandes¹, Sérgio Tadeu Sibov²

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO

nandapr_fernandes@hotmail.com, stsibov@yahoo.com.br

Palavras-chave: cultura de tecidos, bromélias, propagação *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

Várias espécies de bromélias têm recebido atenção de um número cada vez maior de pesquisadores e melhoristas. A importância econômica das bromélias está na sua crescente utilização em projetos paisagísticos, por causa da beleza de suas flores, resistência e praticidade no manuseio, além de formar um micro-habitat para diversos grupos de organismos. Durante o ciclo vital, de acordo com a espécie e/ou condições ambientais, a planta floresce e frutifica somente uma vez. Porém, uma vez coletadas as sementes, consegue-se em curto espaço de tempo, com a germinação *in vitro*, grande quantidade de mudas, sendo a taxa de multiplicação muito superior à obtida *in vivo* (Tombolato & Costa, 1998).

Técnicas de cultura de tecidos *in vitro* representam um importante conjunto de tecnologias em todas as áreas da biologia vegetal, auxiliando na compreensão dos processos da biologia do desenvolvimento e para a utilização e conservação dos recursos genéticos vegetais (Withers & Williams, 1998). A propagação *in vitro*, ou micropropagação, é uma das técnicas mais utilizadas e relaciona-se principalmente com a obtenção de mudas uniformes, de alta qualidade e livres de doenças, permitindo a multiplicação rápida e geneticamente confiável, além de possibilitar a preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção.

Uma das principais vantagens da micropropagação é a maior rapidez regenerativa em relação a outros métodos de propagação vegetativa, convencionalmente utilizados, facilitando

- Revisado pelo orientador -

¹ Orientanda, Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, UFG;

² Orientador, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFG;

a propagação onde as tecnologias convencionais são difíceis ou até mesmo impossíveis de serem realizadas (George, 1993). Nas bromélias, a propagação clonal por divisão natural de brotações laterais é de baixa frequência, originando poucos afilhos/planta/ano. No entanto, a propagação por meio da cultura de tecidos apresenta muitas vantagens, proporcionando o desenvolvimento de protocolos para a conservação do germoplasma e para a micropropagação massal que podem ser utilizados em escala comercial, diminuindo a pressão de extração destas espécies do seu habitat natural.

A espécie *Aechmea tocantina* Baker pertence à família Bromeliaceae, subfamília Bromelioideae, e é nativa, mas não endêmica do Brasil, podendo ser encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia e do Cerrado. Possui hábito epifítico, terrestre ou saxícola (Bert & Luther, 2005). Apesar das espécies do Cerrado serem pouco exploradas para finalidades ornamentais estas apresentam grandes potencialidades conforme foi relatado por Carneiro (2002). Entretanto, para uma exploração racional, visando sua utilização comercial são necessários maiores conhecimentos de suas características, como sua fenologia, comportamento em condições de cultivo e condições de propagação, destacando-se a propagação vegetativa *in vitro*.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *A. tocantina* além de verificar a capacidade morfogenética e propagativa das plântulas formadas *in vitro*, como contribuição a um futuro programa de melhoramento genético da espécie e ao desenvolvimento de protocolos para sua propagação em escala comercial.

3. METODOLOGIA

Germinação *in vitro*: os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Sementes de *A. tocantina* foram extraídas de frutos coletados, em setembro de 2009, de um exemplar da espécie pertencente à Coleção de Bromélias Nativas do Cerrado da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG. Logo após a colheita, os frutos foram espremidos em peneira fina e as sementes lavadas em água corrente, para a retirada da mucilagem. As

sementes foram colocadas sobre folhas de papel e postas para secar à sombra, em temperatura ambiente, por uma semana. Para a descontaminação, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio comercial a 20% (0,4% de cloro ativo) por 10 minutos. Após esse procedimento, dentro da câmara de fluxo laminar, foi realizada a tríplice lavagem em água destilada e esterilizada. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade dos macronutrientes (MS 50%). As sementes foram divididas em cinco tratamentos: (T1) MS 50%; (T2) MS 50% + 0,5 mg/L de Ácido Giberélico (GA₃); (T3) MS 50% + 0,5 mg/L de GA₃ + 0,1 mg/L de 6-Benzilaminopurina (BAP); (T4) MS 50% + 0,5 mg/L de GA₃ + 0,5 mg/L de BAP; (T5) MS 50% + 0,5 mg/L de GA₃ + 1,0 mg/L de BAP. O pH de todos os tratamentos foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar (7,5 g/L) e autoclavados a 120°C a 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 11 repetições, em que cada parcela consistiu de um frasco com 30 ml de meio e 15 sementes. A avaliação da taxa de germinação, número de folhas, comprimento da parte aérea e número de raízes foi feita a cada 15 dias durante 90 dias. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Multiplicação *in vitro*: após as análises de germinação e crescimento inicial, as plântulas formadas foram mantidas nos meios por mais 90 dias e então repicados. Foi feita a medição quanto ao tamanho da parte aérea e o tamanho das raízes e, em seguida, as plântulas foram transferidas para o meio de cultura MS 50% dos macronutrientes, acrescido de 7,5 g/L de Agar e pH ajustado para 5,8, sem acréscimo de reguladores de crescimento. Após 30 dias, as plântulas foram transferidas para novos meios com diferentes concentrações de reguladores de crescimento para a indução de multiplicação de novos brotos. Foram elaborados dez tratamentos: (T1) MS 50%; (T2) MS 50% + 1,0 mg/L de Ácido Naftalenoacético (ANA) + 1,0 mg/L de BAP; (T3) MS 50% + 1,0 mg/L de ANA + 2,5 mg/L de BAP; (T4) MS 50% + 1,0 mg/L de ANA + 5,0 mg/L de BAP; (T5) MS 50% + 2,5 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP; (T6) MS 50% + 2,5 mg/L de ANA + 2,5 mg/L de BAP; (T7) MS 50% + 2,5 mg/L de ANA + 5,0 mg/L de BAP; (T8) MS 50% + 5,0 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP; (T9) MS 50% + 5,0 mg/L de ANA + 2,5 mg/L de BAP; (T10) MS 50% + 5,0 mg/L de ANA + 5,0 mg/L de BAP. O pH de todos os tratamentos foi ajustado para 5,7 antes da adição de ágar

(7g.L⁻¹) e autoclavados a 120°C a 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 30 repetições, em que cada parcela consistiu de um frasco com 20 ml de meio com uma plântula por frasco. A avaliação do número de brotos e presença de raízes foi realizada a cada 15 dias durante 90 dias. Os resultados serão submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Enraizamento *in vitro*: após as análises de multiplicação, as plântulas formadas foram inoculadas em novos meios com outros reguladores em novas concentrações que pudessem auxiliar o enraizamento das mesmas. Foram elaborados oito tratamentos: (T1) MS 50% + 0,2 mg/L de ANA + 2g/L de carvão ativo + 30 g/L de sacarose; (T2) MS 50% + 0,2 mg/L de ANA + 2 g/L de carvão ativo + 15 g/L de sacarose; (T3) MS 50% + 0,2 mg/L de ANA + 30 g/L de sacarose; (T4) MS 50% + 0,2 mg/L de ANA + 15 g/L de sacarose; (T5) MS 50% + 2g/L de carvão ativo + 30 g/L de sacarose; (T6) MS 50% + 2g/L de carvão ativo + 15 g/L de sacarose; (T7) MS 50% + 30 g/L de sacarose; (T8) MS 50% + 15 g/L de sacarose. Foi acrescentado a todos os tratamentos 7,5 g/L de Agar e pH ajustado para 5,8 e autoclavados a 120°C a 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 30 repetições, em que cada parcela consistiu de um frasco com 30 ml de meio com uma plântula por frasco. A avaliação da presença de raízes está sendo feita a cada 15 dias durante um período de 90 dias (esta etapa ainda está sendo realizada e as plântulas ainda estão sendo avaliadas).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de esterilização das sementes foi eficiente, uma vez que houve contaminação em apenas quatro frascos (7,3% do total). O meio de cultura e os reguladores de crescimento não influenciaram significativamente a porcentagem de germinação de sementes de *A. tocantina*. Não se observou diferença significativa, pelo teste F, na taxa de germinação entre os tratamentos ($p = 0,257$). Entretanto, a taxa de germinação foi alta em todos os tratamentos. Aproximadamente 20 dias após a inoculação, a taxa de germinação das sementess em todos os tratamentos ficou igual ou superior a 65% (**Tabela 1 e Figura 1**).

Tabela 1. Total de sementes germinadas por tratamento e a média de germinação por frasco de cada tratamento.

Tratamento	Total de sementes	Sementes germinadas	Média de germinação	Taxa de germinação (%)
T1	145	100	10 ± 2,16	68,96
T2	145	101	10,1 ± 1,52	69,65
T3	160	115	10,45455 ± 2,01	71,87
T4	145	103	10,3 ± 2,4	71,03
T5	145	108	12 ± 2,39	74,48
Total	740	527	10,57091 ± 0,81	71,21

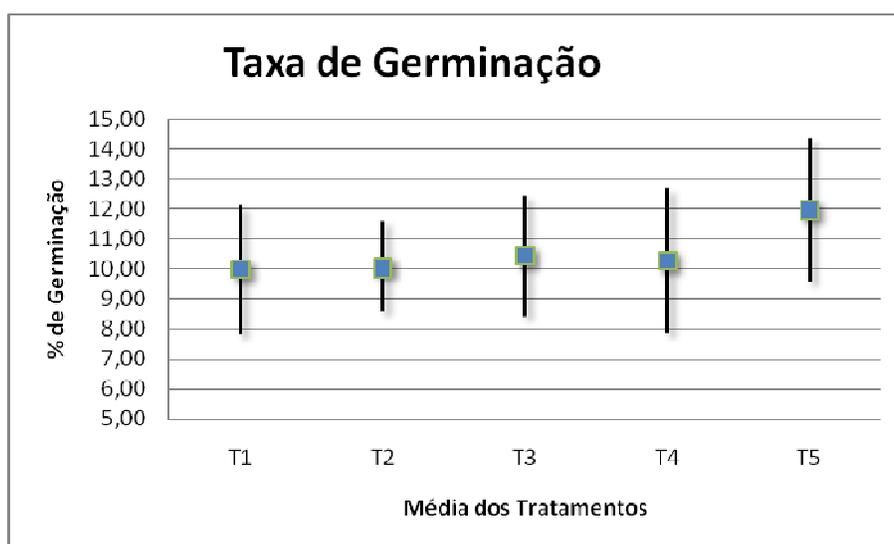


Figura 1. Média da taxa de germinação por tratamento e a variação obtida para esta medida. As extremidades das linhas indicadas para cada tratamento foram obtidas pelos valores dos desvios padrão.

Durante a fase de estabelecimento da plântula *in vitro*, após a germinação, a presença dos reguladores de crescimento favoreceu significativamente o número de folhas (**Tabela 2 e Figura 2**) e o comprimento da parte aérea (**Tabela 3 e Figura 3**). Porém, não houve diferenças significativas para o número de raízes ($p = 0,0879$).

Tabela 2. Valores médios de números de folhas obtidos para plântulas de *Aechmea tocontina* Baker durante a fase de estabelecimento *in vitro*.

Tratamentos				
T1	T2	T3	T4	T5
16.65 a ¹	15.27 a	14.78 a	11.25 b	9.71 b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5%.

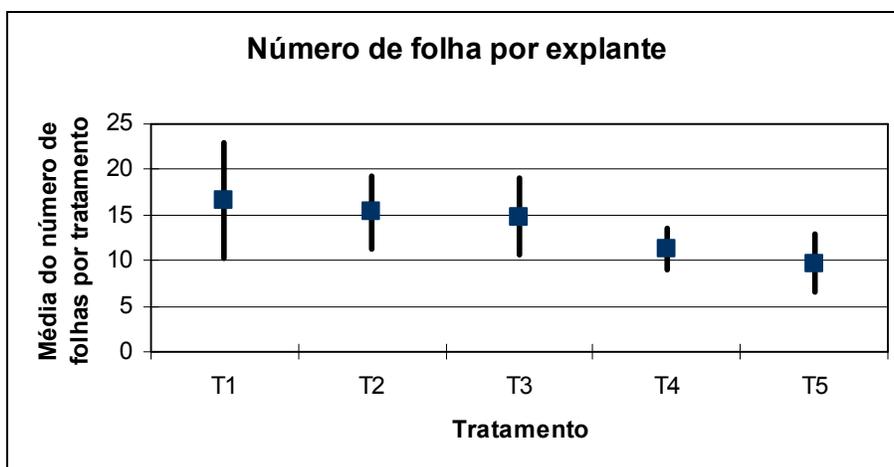


Figura 2. Média do número de folhas emitidos por cada explante e a variação obtida para esta medida. As extremidades das linhas indicadas para cada tratamento foram obtidas pelos valores dos desvios padrão.

Tabela 3. Valores médios do comprimento da maior folha de cada plântulas de *Aechmea tocontina* Baker durante a fase de estabelecimento *in vitro*.

Tratamentos				
T1	T2	T3	T4	T5
4,12 a ¹	3,66 a	3,88 a	3,08 b	1,97 b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5%.

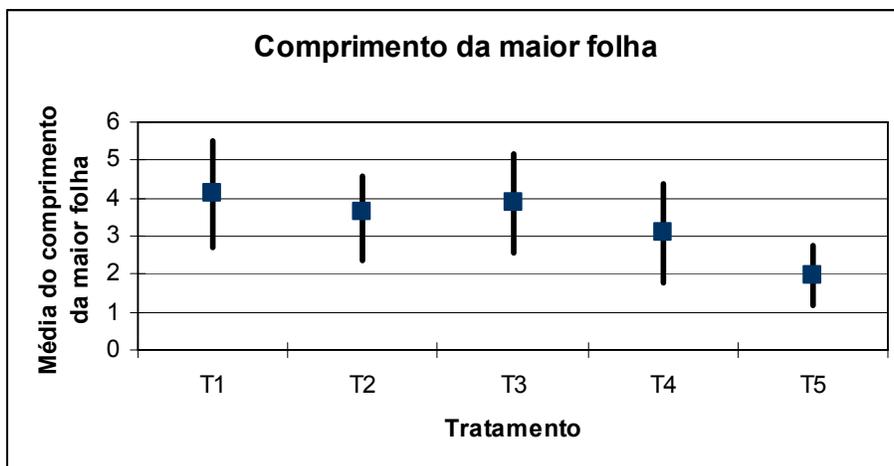


Figura 3. Média do comprimento da maior folha de cada explante e a variação obtida para esta medida. As extremidades das linhas indicadas para cada tratamento foram obtidas pelos valores dos desvios padrão.

Durante a fase de germinação, todos os tratamentos levaram a formação de raiz. Houve uma dificuldade na contagem das raízes e na mensuração do comprimento das mesmas devido ao emaranhado que elas formavam dentro do frasco.

Seis meses após a inoculação das sementes, as plântulas que iniciaram seu desenvolvimento foram transferidos para um meio de descanso, com macro e micronutrientes porém sem reguladores de crescimento. Esta repicagem é realizada para evitar que efeitos acumulativos dos reguladores utilizados nos tratamentos anteriores interfiram nas novas concentrações elaboradas para o próximo experimento visando a indução de multiplicação destas plântulas.

Na multiplicação o tratamento T9 foi o gerou um maior número de brotos, seguido pelos tratamentos T8, T10, T7, T6, T5 e os demais tratamentos tiveram uma quantidade mínima de brotos (Tabela 4). Pode-se ainda observar que o único tratamento no qual houve crescimento de novas raízes foi o T1, o qual não continha nenhum tipo de regulador (Tabela 5).

Tabela 4. Valores médios do número de brotos obtidos para cada plântula de *Aechmea tocartina* Baker durante a fase de multiplicação *in vitro*.

Tratamento	Número de Brotos
------------	------------------

T9	2,08 a ¹
T8	1,28 ab
T10	1,18 ab
T7	0,96 ab
T6	0,79 ab
T5	0,65 ab
T2	0,48 b
T3	0,48 b
T4	0,44 b
T1	0 b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5%.

Tabela 5. Valores médios do número de raiz por cada tratamento com plântulas de *Aechmea tocanina* Baker durante a fase multiplicação *in vitro*.

Tratamento	Presença de raiz
T1	1,0 a ¹
T8	0,03 b
T10	0 b
T2	0 b
T3	0 b
T4	0 b
T5	0 b
T6	0 b
T7	0 b
T9	0 b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5%.

O experimento de enraizamento ainda está em curso. Até o presente momento, 45 após a inoculação das plântulas, em apenas três tratamentos (T3, T4 e T8) foi observada a presença de raízes, sendo apenas uma em uma planta em cada um dos três tratamentos.

5. CONCLUSÕES

- A germinação *in vitro* de sementes de *A. tocanina* não é influenciada pela presença de Ácido Giberélico (GA₃) e 6-Benzilaminopurina (BAP).
- Durante a fase de estabelecimento das plântulas *in vitro*, após a germinação, GA₃ e BAP também não influenciaram significativamente a produção de novas folhas, o comprimento destas folhas e a produção de raízes.

- A utilização de meio MS, com metade da concentração de macronutrientes, sem a adição de reguladores de crescimento, proporciona resultados similares aos demais tratamentos com GA₃ e BAP durante a germinação *in vitro* e o posterior estabelecimento das plântulas.
- Após a germinação, na fase de estabelecimento, a presença de 6-Benzilaminopurina (BAP) atrapalha o desenvolvimento da plântula.
- Na fase de multiplicação, quanto maior a concentração de ácido naftalenoacético (ANA), maior o número de brotos emitidos por plântula.
- A presença de ANA e BAP, na fase de multiplicação, inibiram o crescimento de novas raízes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARNEIRO, M.F. Caracterização e aproveitamento ornamental de espécies da família Bromeliaceae do Estado de Goiás. 2002. 115f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 1999.

BERT, T.M. & H.E. LUTHER. 2005. Aechmea information. Mulford B. Foster, Bromeliad Identification Center. (http://fcb.org/articles/Aechmea_spp_table.pdf). Acesso: 09/06/2011.

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology, London: Exegetics Ltd., England, 574p. 1993.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. Physiologia plantarum, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-97, 1962.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas: IAC, 1998. 72 p.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília-DF: EMBRAPA, 1998. v. 1, p. 297- 330.