

DANIELA SOARES DOS SANTOS

**Micropropagação da bromélia ornamental**  
***Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch**  
**e a influência do etileno**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2009

DANIELA SOARES DOS SANTOS

**Micropropagação da bromélia ornamental**  
***Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch**  
**e a influência do etileno**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. CATARINA CARVALHO NIEVOLA

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Santos, Daniela Soares dos

S237m Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.)  
Klotzsch e a influência do etileno / Daniela Soares dos Santos -- São Paulo, 2009.  
121 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio  
Ambiente, 2009  
Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Gás. I. Título

CDU : 582.564

Dedico,  
Aos meus pais João dos Santos Filho e  
Sonia Soares dos Santos.

**À minha orientadora  
Dra. Catarina Carvalho Nievola**

Muito obrigada por todos os ensinamentos, dedicação e paciência durante todo o desenvolvimento do trabalho em especial na finalização dessa dissertação. Desde o início, na graduação, sempre acreditando em uma capacidade que nem eu mesma imaginava que existia em mim. Sempre aprendi muito com você, seja como pesquisadora, professora e principalmente como pessoa, um exemplo de profissionalismo e seriedade em tudo o que faz. Que Deus ilumine seu caminho e desejo que a paz, a alegria e o amor sejam constantes em sua vida.

## Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica de São Paulo nas pessoas da Diretora Geral Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi. Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente nas pessoas da Dra. Solange Cristina Mazzoni Viveiros e Dra. Sônia M. C. Dietrich, e a todos os docentes e alunos, em especial à secretária Márcia Regina Angelo, e ao Antonio Aparecido Carlos Borges, sempre dispostos a auxiliar em todos os momentos.

A Capes por ter concedido a bolsa de estudo, fundamental para a execução do projeto.

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, por ter viabilizado os estudos com etileno. Em especial à Dra. Maria Aurineide Rodrigues, pelo acompanhamento nos estudos com etileno, sempre disposta a contribuir com suas experiências, agradeço pelos ensinamentos e paciência, que mesmo em fase de finalização de projeto esteve sempre disposta a ajudar.

À Dra. Vivian Tamaki, sempre buscando melhorias no laboratório da Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica, onde desenvolvi a maior parte do trabalho de mestrado.

À Seção de Anatomia do Instituto de Botânica, em especial à Fernanda Tresmondi, responsável pelos cortes anatômicos, além da amizade e atenção dispensada a mim.

À Seção de Sementes do Instituto de Botânica, em especial ao Edmir Vicente Lamarca, devido ao auxílio na coleta de gases viabilizando a execução de um capítulo deste trabalho, e também pela amizade durante o curso.

Aos pesquisadores da Seção de Ornamentais Clóvis, Armando, Francismar, Vanessa, Domingos e Silvia, pelo convívio animado no laboratório. Em especial ao pesquisador Dr. Shoey Kanashiro por toda a atenção e dedicação em relação aos diferentes contratemplos no laboratório, sempre disposto a ajudar e ensinar.

Aos funcionários da Seção de Ornamentais, Ivomar Aparecido Medina e Luzia Rodrigues Scarpeta amigos e companheiros do dia-a-dia, dividindo sempre, principalmente as coletas. Ao Sr. Geraldo sempre disposto a colaborar.

Aos estagiários da Seção de Ornamentais e também os ex-estagiários pelo convívio e aprendizado constante. Em especial à Luciana Cabral, amiga e companheira.

À minha grande amiga Cristiane Marinho Guimarães, por sempre me apoiar e me amparar nos momentos mais difíceis, pela paciência, por me alegrar nos momentos de tensão, companheira de todas as horas.

Agradeço ao Sr. Walter Pereira, da Rohm and Haas Company, pela doação do SmartFresh<sup>TM</sup>, o que viabilizou os estudos com etileno.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
BROMELIACEAE .....	1
CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS DE INTERESSE ECONÔMICO .....	5
Seleção do explante .....	8
Desinfestação .....	10
Meio nutritivo .....	12
Condições de luminosidade .....	16
Vedação dos frascos .....	18
Acúmulo de gases .....	20
Etileno .....	21
Transferência das plantas produzidas <i>in vitro</i> para cultivo em casa de vegetação .....	22
PROPOSTA PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO .....	24
OBJETIVOS .....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
<b>CAPÍTULO 1 - Micropropagação da bromélia ornamental <i>Acanthostachys strobilacea</i> (Schultz F.) Klotzsch</b> .....	44
RESUMO .....	44
ABSTRACT .....	45
INTRODUÇÃO .....	47
MATERIAL E MÉTODOS .....	50
Coleta de sementes .....	50
Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> a partir de sementes .....	52
Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais .....	53
RESULTADOS .....	54
DISCUSSÃO .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
<b>CAPÍTULO 2 - Influência do etileno no alongamento e anatomia de plantas de <i>Acanthostachys strobilacea</i> (Schultz F.) Klotzsch cultivadas <i>in vitro</i></b> .....	79
RESUMO .....	79
ABSTRACT .....	80
INTRODUÇÃO .....	81

MATERIAL E MÉTODOS .....	85
RESULTADOS .....	87
DISCUSSÃO .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
<b>CAPÍTULO 3 - Influência do tipo de vedação dos frascos de cultura no alongamento de plantas de <i>Acanthostachys strobilacea</i> (Schultz F.) Klotzsch cultivadas <i>in vitro</i> .</b>	<b>99</b>
RESUMO .....	99
ABSTRACT.....	100
INTRODUÇÃO.....	102
MATERIAL E MÉTODOS .....	105
RESULTADOS .....	109
DISCUSSÃO .....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>119</b>

## RESUMO

Muitos membros de Bromeliaceae são plantas ornamentais devido à beleza de suas folhas, brácteas coloridas e flores vistosas. *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch é uma bromélia saxícola ou epífita de ampla distribuição, pertencente à subfamília Bromelioideae. Devido ao seu valor ornamental, esta espécie tem sido alvo do extrativismo ilegal o que pode desencadear a redução do número de plantas dessa espécie na natureza. Existe, portanto, a necessidade de produzir exemplares dessa espécie, de modo a atender ao mercado de plantas ornamentais e evitar o interesse por exemplares provenientes do ambiente natural. O cultivo *in vitro* pode ser utilizado como uma das etapas para a produção de espécies de importância econômica, dentre elas, plantas ornamentais potencialmente ameaçadas de extinção. Adicionalmente, essa técnica tem permitido o desenvolvimento de estudos de fisiologia por permitir o controle de fatores como fornecimento de luz, nutrientes e temperatura. Contudo, devido à necessidade dos frascos de cultivo ser mantidos fechados para evitar a contaminação, existe a possibilidade de que gases produzidos pelas plantas em cultivo sejam acumulados e interfira no desenvolvimento da planta, um aspecto pouco abordado. Além da utilização de sementes, é possível, para algumas espécies, desenvolver a micropropagação utilizando-se outros explantes, provenientes de plantas mantidas *in vitro*. Este trabalho apresenta um protocolo para a produção de mudas de *A. strobilacea* a partir de sementes e segmentos nodais obtidos de plantas cultivadas *in vitro*, além de investigar as razões pelas quais as plantas dessa espécie apresentam um alongamento do eixo caulinar quando cultivadas nessa condição. A desinfestação das sementes foi feita com ácido clorídrico a 25 % seguido de solução comercial de hipoclorito de sódio a 2 %. A composição do meio nutritivo favorável à obtenção de segmentos nodais como explantes para a produção de plantas foi o de Murashige & Skoog (MS) contendo os macronutrientes reduzidos a 1/5, além de 0,20 % de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina. O pH foi ajustado em 5,8. O meio foi geleificado (6 g L<sup>-1</sup> de Agar) e esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Os frascos de cultivo foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram<sup>®</sup>, super luz do dia 40 W). Quando frascos de cultura foram colocados nas mesmas condições, porém sob diferentes intensidades luminosas, verificou-se que na intensidade luminosa de 14 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ocorreu maior alongamento das plantas, em

comparação àquelas mantidas sob intensidades mais altas e, na ausência de luminosidade. Observou-se que a os segmentos nodais isolados, provenientes da região mediana e basal do caule, quando transferidos para meio de cultura, originaram plantas alongadas; os segmentos oriundos da região apical produziram plantas não alongadas, o que indica uma possível influência do gradiente hormonal endógeno. Somente as plantas não alongadas sobreviveram após a transferência para condições *ex vitro*. No entanto, as plantas que apresentaram o alongamento constituíram um importante material para fornecer segmentos nodais para a manutenção da produção de plantas *in vitro*, viabilizando a formação de clones. Verificou-se que o alongamento das plantas ocorreu exclusivamente devido a fatores relacionados ao cultivo *in vitro*, como o tipo de vedação dos frascos que possibilitava o acúmulo de gases no interior dos mesmos. As plantas que apresentaram maior alongamento desenvolveram-se no interior dos frascos vedados com tampas de plástico envoltas por filme de PVC. O alongamento das plantas foi atribuído ao efeito do gás etileno que poderia ter-se acumulado no interior dos frascos. Experimentos realizados com aplicação exógena de etileno e do inibidor de receptores desse gás 1 – metilcilopropeno (1-MCP) mostraram que esse hormônio influenciou a anatomia das plantas cultivadas *in vitro* induzindo o aumento do diâmetro da célula. Portanto, além do estabelecimento de um protocolo para a produção de plantas da bromélia ornamental *A. strobilacea* por meio do cultivo *in vitro* de sementes e segmentos nodais, este trabalho verificou aspectos relacionados à fisiologia dessa espécie. Fatores como a intensidade luminosa, a posição do segmento nodal no eixo caulinar e acúmulo de etileno no interior dos frascos, alteraram a morfologia de plantas produzidas *in vitro*, induzindo um alongamento do caule, pouco freqüente em plantas cultivadas na presença de luz. Por meio do protocolo de cultivo *in vitro* estabelecido neste trabalho foi possível obter-se a partir de uma única semente, após um ano, cerca de 15.000 plantas cultivadas em vasos. A possibilidade de utilizar diluições do meio MS, sem reguladores de crescimento contribui para a redução dos custos de produção, além de minimizar a variação somaclonal atribuída, em muitas espécies, à utilização desses reguladores. O estabelecimento do cultivo de espécies ornamentais que são retiradas ilegalmente do ambiente natural é estratégia importante para sua preservação.

Palavras-chave: Bromeliaceae, cultivo *in vitro*, gases

## ABSTRACT

Many members of the Bromeliaceae are ornamental plants due to the beauty of their leaves, colored bracts and dashing flowers. *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch is an saxicolous or epiphytic bromeliad of broad distribution, of the Bromelioideae subfamily. This species have been being target of illegal extrativism, which can triggers the reduction of number of individuals in nature. There is, hence, the need of producing clone, in a way to answer the ornamental plants market and to avoid, with this, the interest for copies from the natural environment. *In vitro* cultivation can be used like one of the stages for the economic importance species, among they, potentially extinction threaten ornamental plants. In addition, this technique has been allowing the basics physiology studies development because it allows the control of factors like the light catering, nutrients and the temperature control. Although, the need of keeping the cultivation bottles up closed to avoid the contamination, there is the possibility that these gases produced by plants in cultivation be amassed into them influencing on the plant development. This aspect is little broached. Although the bromeliads cultivation *in vitro* establishment from the utilization of seeds be usually, is possible, for some species, to develop the micropropagation using others explants, from plants which are kept up *in vitro*. This work presented a protocol to the *Acanthostachys strobilacea* seedling production from the utilization of seeds and nodal segments obtained from plants which were cultivated *in vitro*, besides investigating the reasons for this species plants presents a stem elongation when cultivated in this condition. The seeds disinfection was obtained with chloridric acid at 25% followed by sodium hypochlorite at 2% commercial solution. The nutritive solution composition to the plant elongation to facilitate the obtaining of nodal segments like explants for the plants production was the Murashige & Skoog (1962) (MS) one containing the micronutrients in the original concentration and the macronutrients reduced to 1/5. It was added to these salts 20 g.L<sup>-1</sup> of saccharose, 100 mg L<sup>-1</sup> of myo-inositol e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de thiamine. The pH was ajusted in 5,8. The environment was gelled (6 g L<sup>-1</sup> de Agar) and sterilized in autoclave for 15 minutes at 121 °C. The cultivation bottles were kept up in growth room at 26 ± 2 °C temperature, photoperiod of 12 hours and irradiance of 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, supplied by fluorescent lamps (Osram<sup>®</sup>, super luz do dia 40 W). When cultivation bottles were put at the same conditions although in different ligh intensities, it was verified that at the 14 µM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> light intensity it was observed a plants large elongation in comparison to those ones which were kept up under high intensities and, including,

the light absence. It was observed that the explants position which were cultivated previously *in vitro* plants stem influenced the elongated plants obtaining. The isolated nodal segments from the median and basal region of stem, when transferred to the nutrition solution, originated elongated plants; the segments from the apical region produced not elongated plants, which indicate a possible endogenous hormonal gradient influence. Only the not elongated plants survived after its transfer to *ex vitro* conditions. However, the plants which presented the elongation became an important material which, kept up in cultivation, supplied other nodal segments used like explants for the *in vitro* plants production maintenance, making possible the formation of clones. It was verified that the stem elongation occurred exclusively due to factors related to the *in vitro* cultivation, like the bottles' stopping up type which enabled the gas amassing into them. The plants which presented the large elongation developed it selves into the plastic lids stopped up bottles wreathed by PVC film in comparison to those ones growth in bottles with plastic lids, without PVC film. The stem elongation was ascribed to the ethylene gas effect which it is possible accumulated into the flasks. Experiments where exogenous application of ethylene and of this gas inhibitor 1- metilcilopropeno (1-MCP) shown that this hormone influenced the anatomy of the plants which were cultivated *in vitro* inducing to a cell diameter increase. Hence, besides the establishment of a protocol for the ornamental bromeliad plants production, *A. strobilacea* by seeds and nodal segments *in vitro* cultivation, this work verified physiology related aspects of this species. It was possible to verify that factors like light intensity, the position of the nodal segment at the stem and the ethylene into the flasks, changed the *A. strobilacea* plants produced *in vitro* morphology, inducing a stem elongation, few frequent in plants cultivated at the presence of light. Through cultivation *in vitro* protocol established in this work, is possible to obtain from only one seed, after one year, about 15.000 *A. strobilacea* plants cultivated in flower-pots. The possibility of using nutrition solution MS dilutions, without growth regulators contributes to the production cost decrease, besides minimizing the somaclonal variation to take place for many species, to the use of these regulators. The cultivation establishment of ornamental species that are illegally taken out from its natural environment is important strategy for its preservation.

Keywords: Bromeliaceae, *in vitro* culture, gas

## INTRODUÇÃO GERAL

### BROMELIACEAE

Bromeliaceae representa uma das maiores famílias com distribuição neotropical, compreende 57 gêneros e aproximadamente 3.086 espécies (Luther 2006) distribuídas em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae. Ocupam ambientes que variam quanto à disponibilidade de água e seus representantes são encontrados em todos os tipos de vegetação, desde ambientes mesofílicos até xéricos (Smith & Downs 1974, 1977, 1979), em diferentes altitudes sob intensidades luminosas variáveis. A família abriga uma grande diversidade de formas de vida, algumas são terrestres, epífitas dotadas de fitotelmatas (sobreposição de bainhas foliares nas quais podem ficar retidos água e nutrientes), ou ainda epífitas extremas, cujas espécies são completamente independentes do solo para nutrição. O sucesso da transição entre o hábito terrestre para o epífito tem sido relacionado ao surgimento de tricomas na superfície foliar característico da família aos quais tem se atribuído função na nutrição (Benzing 2000).

Dada à variedade de ocupação na natureza pelas espécies de bromélias, Benzing (1980) sugeriu uma classificação ecológica fundamentada no grau de independência do solo como fornecedor de nutrientes. A subfamília Pitcairnioideae, que abrange um maior número de representantes terrestres, possui raízes cuja função é a de absorver nutrientes. Membros da subfamília Bromelioideae apresentam características bem variadas, podendo ser terrestres ou epífitas, sendo a raiz responsável pela absorção de nutrientes e/ ou fixação. Em Tillandsioideae estão agrupados indivíduos cujas raízes têm como função principalmente a fixação da planta no substrato, sendo consideradas espécies mais especializadas.

O surgimento do hábito epífito veio acompanhado do desenvolvimento de escamas em níveis variáveis de especialização além de uma redução do sistema radicular. Evolutivamente o ovário tende a ser cada vez mais protegido, resultando em ovário ínfero nos indivíduos morfologicamente derivados, portanto o desenvolvimento do fruto leva a uma dispersão das sementes cada vez mais especializada. Existem dois tipos de frutos na família, o capsular, dotada de muitas sementes pequenas com presença de apêndices dispersadas pelo vento, e a forma bacacea, onde as sementes são maiores e produzidas em menor quantidade (Smith & Downs 1974).

Muitas espécies de Bromeliaceae possuem síndrome de dispersão por endozoocoria, em que o animal ingere o fruto e elimina o diásporo (Dittrich *et al.* 1999). Faustino e Machado (2006) observaram a ave *Schistoclamys ruficapillus* alimentando-se do fruto inteiro da bromélia *Hohenbergia ramageana*. Outras aves, como *Pipra rubrocapilla* (Pipridae) e *Tangara faustuosa* (Thraupinae) foram observadas dispersando frutos de *Canistrum aurantiacum* (Siqueira Filho & Machado 2001). *Aechmea nudicaulis* também é citada como espécie ornitocórica por Gonçalves & Waechter (2003). Sementes de *Aechmea lindenii* são dispersas por pássaros das famílias Thraupidae e Pipridae, segundo trabalho realizado por Lenzi *et al.* (2006).

*Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch, é uma espécie de ampla distribuição pertencente à subfamília Bromelioideae. Pode ser encontrada como saxícola ou epífita, desenvolvendo-se preferencialmente nas bifurcações dos troncos (Reitz 1983) (Figura 1). Floresce durante a estação seca, período em que poucas flores, cuja polinização é realizada pelas aves, estão disponíveis no sudeste do Brasil (Sazima *et al.* 1995). Seu polinizador fica empoleirado de cabeça para baixo sobre as longas folhas espinhosas (Sazima & Sazima 1999). As infrutescências formam grandes bagas e produzem cerca de oito sementes por fruto cuja dispersão destas é realizada pelas aves (Figueiredo 2003).

Figueiredo (2003), em Minas Gerais, cita que a população desta espécie está sendo drasticamente reduzida devido à retirada das árvores que servem de suporte para ela. Outro fator que contribui para esta redução são as características morfológicas que lhe servem de atributo ornamental sendo alvo de extrativismo ilegal, contribuindo para a redução dos indivíduos desta bromélia na natureza. Alguns exemplares têm sido comercializados na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP). Segundo Lawn (2008), existe um crescimento intenso pela procura de espécies que podem ser cultivadas em cestos suspensos, dentre elas *A. strobilacea*, provavelmente devido à presença de folhas que chegam a atingir até 2 m de comprimento (Figura 2).

Pereira (1988) descreveu detalhadamente o estágio de desenvolvimento de planta normal de *A. strobilacea*, e constatou que logo no início do desenvolvimento esta planta apresenta suas duas primeiras folhas elevadas pelo entrenó, o que a distingue de outras espécies. Existem poucos estudos sobre a multiplicação da espécie.



Figura 1. (A) *Acanthostachys strobilacea* na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, São Paulo. (B) Características morfológicas de *A. strobilacea* registradas na prancha 63 da Flora Brasiliensis Vol. III, Part III, Fasc. 112, publicada em 15-Mai-1892. (C) detalhe dos tricomas presentes ao longo da lâmina foliar (D) inflorescência de *A. strobilacea* no campo e (E) infrutescência em diferentes níveis de maturação, (1) imatura, (2) 3 meses depois e (3) 6 meses depois.



Figura 2. Utilização de *A. strobilacea* como planta ornamental, fotos extraídas da internet. Fonte: (A) <http://www.charlies-web.com/bromeliads-alphalist/guestphotos/pix.html>, (B) <http://fchs.org/pictures/bscf02.htm>, (C) <http://www.bromeliads.info/archives/acanthostachys-bromeliad-plant-species> e (D) [http://www.top-tropicals.com/cgi-bin/garden\\_catalog](http://www.top-tropicals.com/cgi-bin/garden_catalog).

Apesar de suas características atrativas e de alguns exemplares terem sido encontrados a venda, não existem relatos da produção dessa espécie voltada a atender o mercado de plantas ornamentais.

## CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS DE INTERESSE ECONÔMICO

Cultivo *in vitro* é a cultura de células ou órgãos vegetais, em frascos de cultivo contendo meio nutritivo sob ambiente controlado (Hartmann *et al.* 2002). Muitos aspectos da biotecnologia têm levado a um aumento no interesse na pesquisa do cultivo *in vitro* de plantas. Micropropagação é uma área em expansão na produção comercial, pois permite rápida multiplicação de material vegetal geneticamente idêntico de matrizes selecionadas (Mercier & Kerbauy 1997), atendendo demanda específica do mercado interno e externo, como por exemplo, época de floração, coloração, tamanho e forma das flores, número de flores por planta entre outros aspectos (Kerbauy 1997). Outra vantagem dessa técnica é a produção de plantas livre de doenças (Mercier & Kerbauy 1997), pois plantas propagadas convencionalmente, uma vez infectadas por microorganismos endógenos, transmitem os patógenos às gerações seguintes, resultando em uma diminuição no rendimento das culturas. Por meio do cultivo *in vitro* existe a possibilidade do isolamento de regiões livres de microorganismos, como pequenas porções de tecidos meristemáticos apicais que podem ser cultivados em escala comercial (Kerbauy 1997).

A micropropagação teve início com a teoria postulada por volta de 1839, por Schwann e Schleiden em que afirmavam que células vegetais são totipotentes (uma simples célula possui a programação genética necessária para gerar uma planta inteira), ou seja, podem se desenvolver em um organismo completo. Contudo, apenas em 1902, Haberlandt cultivou células isoladas de modo a colocar em prática os conceitos referentes à teoria da totipotencialidade. Ele observou um aumento de volume celular, porém não verificou a ocorrência de divisão celular. Essas células sobreviveram por apenas 20 dias (Hartmann *et al.* 2002).

Algum tempo depois, em 1934, foi mantido por seis meses o crescimento de cultura de calos de algumas espécies arbóreas em meio nutritivo adicionado de auxina e agar. Em 1948, foi descoberta a citocinina, que culminou com a descoberta que o balanço auxina/ citocinina em calo de tabaco poderia induzir a formação de parte aérea ou raiz (Hartmann *et al.* 2002).

Em 1962, foi estabelecido, por Murashigue & Skoog, o meio nutritivo que seria o mais usado na cultura de tecidos. Diversos trabalhos foram então realizados de modo a aperfeiçoar o cultivo e atender necessidades específicas de diversos tipos de tecidos de espécies variadas. A aplicação das técnicas de micropropagação iniciou-se entre as décadas de 1960 e 1970, estendendo-se ao desenvolvimento em pequenos laboratórios comerciais nos Estados Unidos, Europa, Austrália e Ásia sendo expandido em 1980 (Hartmann *et al.* 2002).

No Brasil, a aplicação comercial da micropropagação é relativamente recente, com diversos grupos trabalhando em Instituições públicas de pesquisa e universidades. Poucas são as empresas que atuam na área. Não é prática comum instalar laboratórios junto a viveiros, com exceção de algumas empresas produtoras de orquídeas e outras especializadas em reflorestamento (Grattapaglia & Machado 1998).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos explantes, é a aplicação prática da cultura de tecidos. De acordo com Ferri *et al.* (1969) explante é a estrutura utilizada para propagação ou multiplicação vegetativa de uma planta. Diversos países do mundo utilizam a técnica de micropropagação em escala comercial com intuito de acelerar os métodos convencionais de propagação de espécies de interesse comercial, como as plantas ornamentais (Grattapaglia & Machado 1998).

As técnicas de cultivo *in vitro*, também podem ser utilizadas como instrumento para multiplicação de espécies de plantas ameaçadas, neste sentido, observa-se um aumento na micropropagação nos últimos anos e é provável que esta tendência se mantenha uma vez que diversas espécies vêm enfrentando o risco de extinção (Sarasan *et al.* 2006).

A micropropagação é realizada em quatro estágios, os quais podem ser manipulados através da modificação do meio e das condições ambientais. Esses estágios são: (1) estabelecimento, que envolve a seleção da fonte de explante, desinfestação, meio de cultura e estabilização; (2) multiplicação, que tem como propósito multiplicar a quantidade de brotos necessários ao enraizamento, nesse estágio muitas vezes são utilizados reguladores de crescimento; (3) formação de raiz, que pode ser realizada tanto em condições *in vitro* como *ex vitro* e (4) aclimatização, esse estágio envolve substituição de uma condição heterotrófica (fornecimento de açúcar) para outra autotrófica (livre de açúcar) (Hartmann *et al.* 2002). Entretanto, existem diferenças nos protocolos de multiplicação estabelecidos para diferentes

espécies, que vão depender das peculiaridades do explante bem como da espécie de interesse (Grattapaglia & Machado 1998).

Diversas espécies ornamentais são multiplicadas via cultura de tecidos, como *Lilium longiflorum* cuja micropropagação foi relatada por Nhut (1998). O material vegetal foi submetido a todos os processos mencionados anteriormente: o explante foi desinfestado e depositado em meio de cultura, os mesmos foram submetidos à indução de brotação, multiplicação e subcultivo, e também foi induzido o enraizamento dos brotos e transferidos para condição *ex vitro*. Outra espécie ornamental cultivada *in vitro* é *Gypsophila paniculata* L. micropropagada por Radmann *et al.* (2001), o explante foi depositado em meio nutritivo sem regulador de crescimento, e foram submetidos a enraizamento *ex vitro* e aclimatização. Protocolos de micropropagação são também utilizados em espécies com outros interesses, como o de proteção de espécies ameaçadas ou endêmicas, como *Amomum microstephanum*, endêmica da Índia (Thoyajaksha & Rai 2006), cujo processo de multiplicação é semelhante ao estabelecido para *Lilium longiflorum* e no trabalho realizado por Pereira (2006) com a espécie *Vaccinium cylindraceum* uma espécie protegida.

Os protocolos de micropropagação de espécies ornamentais de bromélias também seguem as etapas descritas anteriormente. Na cultura de tecidos de *Vriesea reitzii*, Rech-Filho *et al.* (2005) induziram uma proliferação celular de plantas já estabelecidas *in vitro*. Os autores denominaram de “protuberâncias” que foram subcultivadas em meio com reguladores de crescimento. Após 10 semanas pequenos segmentos da parte aérea originária destas protuberâncias foram depositados em novo meio nutritivo contendo reguladores de crescimento (ácido naftaleno acético (ANA) e benzilaminopúria (BAP)), e posteriormente os explantes foram subcultivados em meio de cultura contendo ácido giberélico, para então ser multiplicados novamente com uso de ANA e BAP. As plantas produzidas foram aclimatadas.

O cultivo *in vitro* oferece vantagens em relação à produção convencional de plantas. Pickens *et al.* (2003), avaliando o crescimento e a sobrevivência da bromélia *Tillandsia eizii* durante seu cultivo *in vitro* e em estufa, constataram que as sementes germinam mais rapidamente quando cultivadas *in vitro* em relação à casa de vegetação, e também a germinabilidade é maior *in vitro* do que *ex vitro*, e plantas cultivadas *in vitro* expandem suas folhas mais rapidamente em relação as plantas da casa de vegetação.

O desenvolvimento de métodos de propagação de bromélias ornamentais contribui para o fornecimento dessas plantas ao mercado internacional. A

micropropagação tem permitido uma eficiente produção dessas espécies. Entretanto, a multiplicação vegetativa natural tem sido considerada muito baixa, produzindo poucos brotos por planta. Tem sido considerado que o cultivo a partir de sementes não permite uma produção uniforme devido à variabilidade genética e muitas espécies apresentam crescimento lento. Além disso, não há disponibilidade de sementes no mercado. O sucesso na formação de plantas tem sido alcançado através do cultivo *in vitro* de meristema apical, gemas axilares, folhas removidas de plantas adultas e segmentos nodais. Região basal de folhas removidas de plantas cultivadas em condições assépticas gera um grande número de gemas adventícias, as plantas formadas não apresentam alterações na morfologia ou nos padrões de pigmentação, características ornamentais muito apreciadas. Segundo Mercier & Kerbauy (1997), muitas espécies de bromélias formadas a partir do cultivo *in vitro* não apresentam dificuldades de aclimatação quando transferidas para vasos.

O cultivo *in vitro* de *A. strobilacea* foi descrito na dissertação de Figueiredo (2003), onde plantas sem raízes previamente estabelecidas *in vitro* foram subcultivadas em meio nutritivo contendo regulador de crescimento, sendo posteriormente submetidas a uma fase de enraizamento. Esse autor não relatou a possibilidade de utilização de outro tipo de explante além das sementes com objetivo de formar clones, que é importante para a uniformização do cultivo em larga escala. Além disso, utilizaram reguladores de crescimento que podem induzir variações somaclonais segundo Pierik (1987), Zaffari *et al.* (2002) e Joyce *et al.* (2003).

#### Seleção do explante

A seleção e a manutenção da fonte do explante são importantes aspectos no sucesso da micropropagação. Três aspectos necessitam atenção particular: as características genéticas e epigenéticas da planta matriz, controle de patógenos e a condição fisiológica da planta de modo a otimizar o estabelecimento da cultura (Hartmann *et al.* 2002).

As culturas podem ser estabelecidas tanto a partir de fragmentos de tecidos maduros (folhas, caules, etc), quanto de tecidos meristemáticos, constituídos de células em constante divisão celular e geralmente localizados nos ápices do caule e raiz em crescimento (Kerbauy 1997). Apesar de qualquer parte vegetal poder ser usado como explante, procura-se utilizar aqueles que possuem maior porção de tecidos meristemáticos ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia & Machado 1998).

Para estudos básicos aplicados em espécies de importância econômica como o eucalipto, Arruda *et al.* (2000) utilizaram hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* para induzir a proliferação de calos com objetivo de avaliar o efeito da concentração de cálcio na morfogênese *in vitro*. Para *Eucalyptus nitens* foram utilizados meristema apical e segmentos nodais a fim de melhorar a qualidade da árvore para a indústria de papel (Gomes & Canhoto 2003). Outras espécies de importância econômica como laranja também são cultivadas a partir de hipocótilo, como no trabalho desenvolvido por Schinor *et al.* (2006) que teve como objetivo obter um eficiente protocolo de micropropagação de *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citru volkameriana* e *Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*.

Em relação à Bromeliaceae, diversas espécies são micropropagadas a partir de sementes como *Pticaoirnia flammea*, *Vriesea fosteriana* e *Tillandsia pohliana* (Nievola *et al.* 2001), *Vriesea reitzii* (Rech-Filho *et al.* 2005), *Tillandsia eizii* (Pickens *et al.* 2003 e Pickens *et al.* 2006), *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis* (Bellintani *et al.* 2007). Quando o principal objetivo é a preservação do patrimônio genético de uma dada espécie, a micropropagação deve ser iniciada por meio da cultura *in vitro* de sementes coletadas de diferentes populações. Assim que o cultivo é estabelecido, as plantas podem se tornar doadoras de explantes assépticos para micropropagação de bromélia rara e/ou ameaçada de extinção.

Contudo, para muitas espécies, é possível a micropropagação por meio da utilização de fragmento de plantas. Por meio dessa técnica é possível a obtenção de clones, o que é aconselhável quando o objetivo é a produção em larga escala (Mercier & Kerbauy 1997), devido à possibilidade de homogeneizar o lote de plantas produzidas. Várias espécies de Bromeliaceae de interesse econômico têm sido propagadas por meio da utilização de gemas axilares (Almeida 2002 e Silva *et al.* 2004), segmentos caulinares com uma ou mais gemas (Kiss *et al.* 1995 e Mendes *et al.* 2007) e ainda segmentos foliares (Fonseca *et al.* 1999). Dentre os estudos, a maioria utiliza reguladores de crescimento, porém, o uso destas substâncias tem sido associado à indução de variações somaclonais dos tecidos (Pierik 1987, Zaffari *et al.* 2002 e Joyce *et al.* 2003). Tamaki *et al.* 2007 relataram não haver necessidade de fitorreguladores na produção de mudas de abacaxizeiro na etapa de utilização de segmentos nodais provenientes de plantas cultivadas *in vitro*. Neste trabalho, a utilização dos segmentos nodais esteve associada à indução do estiolamento caulinar de plantas de *Ananas comosus* mantidas em ausência de luminosidade.

Segmentos nodais podem ser utilizados na micropropagação de plantas, entretanto a regeneração de nós *in vitro* pode depender da posição que o explante ocupa no eixo caulinar da planta matriz, devido à presença de um gradiente basípeto de auxina ao longo do caule que vai permitir a expressão de potenciais morfogênicos específicos (Termignoni 2005).

A influência da posição do segmento nodal no desenvolvimento de várias espécies de plantas tem sido investigada. Pereira *et al.* (2005) verificaram que o segmento nodal de origem basal foi o mais adequado para a multiplicação *in vitro* de batata. Puddephat *et al.* (1997) utilizaram segmentos nodais das regiões apical, mediana e basal de *Quercus robur* e observaram que as maiores taxas de regeneração de brotos foram obtidos com os segmentos nodais da região mediana do caule. Schinor *et al.* (2006) avaliaram a resposta organogênica de explantes coletados em diferentes regiões do epicótilo (basal, mediana e apical) de diferentes genótipos de *Citrus*. Nhut *et al.* (2001) testaram 7 posições de pedaços de 1mm de comprimento ao longo do caule jovem de *Lilium longiflorum* e observaram que apesar de todos os explantes utilizados formarem brotos, os de origem um e dois que seriam os mais próximos do ápice do caule apresentaram maior índice de regeneração após 60 dias de cultivo, a eficiência de formação de parte aérea diminuiu com o aumento da distância do meristema apical.

Em relação a Bromeliaceae, Souza *et al.* 2003 verificaram que plantas estioladas de *Ananas comosus* apresentaram diferenças na regeneração dos segmentos nodais provenientes de plantas com o ápice. Modificações histológicas ocorreram durante o desenvolvimento, além de alterações nos níveis hormonais endógenos. Os autores mostraram que os explantes com ápice desenvolveram em nova planta em 15 dias e nos explantes sem ápice não foi observado desenvolvimento da gema.

O cultivo *in vitro* de *A. strobilacea* a partir de nós não foi estabelecido, apenas a partir de sementes. No caso do objetivo ser a partir de nós, a posição deste deve ser considerada. Mas para isto, a planta deve estar alongada para possibilitar o isolamento dos nós.

## Desinfestação

O estabelecimento do cultivo *in vitro* requer cuidados especiais em relação ao material vegetal a ser utilizado, uma vez que a proliferação de fungos e bactérias no interior do frasco de cultivo pode inviabilizar a cultura. No processo de desinfestação que é a eliminação de microrganismos superficiais de explantes (Torres *et al.* 1999),

várias substâncias têm sido utilizadas que possuem ação germicida, sendo que as mais comuns são as soluções de etanol e os compostos à base de cloro, tais como hipoclorito de sódio e de cálcio, além de outras substâncias ácidas ou básicas, adicionadas de algumas gotas de detergente. A concentração e o tempo de exposição do tecido a estas substâncias são bastante variáveis (Grattapaglia & Machado 1998).

Tecidos de plantas estabelecidas *in vitro* apresentam algumas vantagens em comparação às culturas iniciadas a partir de tecido de plantas provenientes do campo, pois os explantes provenientes das plantas cultivadas *in vitro* já são assépticos e, portanto, não necessitam serem submetidos a processos de desinfestação, nem sempre eficazes.

Wawrosch *et al.* (1999) utilizaram solução de NaOCl a 0,63 % para desinfestar sementes de *Swertia chirata* que posteriormente foram enxaguadas com água destilada esterilizada em autoclave. Thoyajaksha & Rai (2006) desinfestaram gemas laterais de *Amomum microstephatum* (espécie endêmica de Karnataka na Índia) coletadas em seu ambiente natural, com água da torneira e detergente, fungicida a 0,3 % e uma solução antibacteriana a 0,2 %. Nhut (1998) utilizou meristemas caulinares de *Vaccinum cylindraceum* cultivados *in vitro*. Estes foram lavados sob água corrente e detergente, posteriormente submersos em etanol 70 % e, em seguida, lavados com água destilada e colocados em uma solução aquosa a 0,1% de cloreto de mercúrio.

A desinfestação superficial mais comumente aplicada para Bromeliaceae tem sido o hipoclorito de sódio, em soluções diluídas (1-20%) com algumas gotas de Tween 20<sup>®</sup> em diferentes tempos (5-30 min), em seguida, os explantes são severamente lavados em água destilada antes de ser transferidos para o meio de cultura (Mercier & Kerbauy 1997).

Na desinfestação de sementes de *Vriesea gigantea*, Endres & Mercier (2001), utilizaram etanol 92 % por 5 minutos, e em seguida as sementes foram imersas em solução de NaOCl a 2 %. Carneiro *et al.* (1999) utilizaram solução de etanol a 70 %, hipoclorito de sódio a 5 % com adição de Tween 80<sup>®</sup> para desinfestar sementes de *Neoregelia cruenta*. Rech-Filho *et al.* (2005), desinfestando sementes de *Vriesea reitzii*, utilizaram a mesma concentração de etanol porém em solução mais diluída de hipoclorito de sódio (2 %) em ambos trabalhos o tempo sob o hipoclorito de sódio foi de trinta minutos. Sementes de *Dyckia agudensis* foram submersas em etanol a 70 % e em seguida 60 minutos em 5 % de NaOCl (Silva *et al.* 2007).

Para a maioria das espécies de bromélias somente tratamento com etanol, hipoclorito de sódio e detergente sempre sob agitação é o suficiente para evitar

contaminações (Mercier & Nievola 2003). Contudo, as sementes de *A. strobilacea* são envoltas por uma mucilagem (Figura 3), de difícil remoção, responsável por uma taxa elevada de contaminação (experimentos preliminares).

Como já mencionado anteriormente, os membros de Bromeliaceae apresentam dois tipos de sementes, as que são dotadas de apêndices plumosos que, podem reter partículas responsáveis por causar contaminação do meio de cultura. A remoção mecânica destes apêndices é o suficiente para resolução do problema (Mercier & Kerbauy, 1997). Outras bromélias apresentam sementes na forma de bagas sendo que algumas são envoltas por uma mucilagem cuja remoção pode depender de substância química, como pôde ser observado no trabalho de Grossi (2000), no qual foi utilizado ácido clorídrico para desinfestar sementes de *Aechmea nudicaulis*, além das substâncias usuais, de modo a facilitar a remoção da mucilagem.

Sementes de *A. strobilacea* também apresentam mucilagem, portanto, para o estabelecimento do cultivo *in vitro* dessa espécie, é necessário desenvolver um protocolo de desinfestação adequado para minimizar a contaminação, para que em seguida, possam ser depositadas no meio de cultura.

Embora Pereira (2006) tenha relatado a micropropagação de *A. strobilacea* por meio de sementes, esse autor não menciona qual foi a taxa de contaminação destas. Experimentos prévios, por nós realizados, mostraram que cerca de 40 % das sementes contaminam quando se utiliza apenas hipoclorito de sódio e detergente, apontando para a necessidade de redução dessa taxa de modo a obter-se um protocolo mais adequado à produção.

#### Meio nutritivo

Após o estabelecimento do processo de escolha do explante e desinfestação, a seleção do meio de cultura mais adequado é importante para o estabelecimento do cultivo uma vez que pode ser um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas (Grattapaglia & Machado 1998, Caldas *et al.* 1999). O sucesso no estabelecimento do cultivo, indução e multiplicação dos brotos, pode ser difícil para algumas espécies, diversas plantas têm necessidades específicas para a multiplicação *in vitro* então, variações substanciais existem nas formulações do meio de cultura. Em geral, requerimentos de sais minerais variam de um grupo de planta a outro, bem como fitorreguladores específicos ou suplementos orgânicos aumentam bastante a regeneração e crescimento em muitos casos (Sarasan *et al.* 2006).



Figura 3. (A) *A. strobilacea* na natureza, (B) detalhe da inflorescência (seta) e fruto (círculo) e (C) fruto com sementes maduras expostas (círculo) envoltas por mucilagem (seta).

Os meios de cultura incluem um suporte semi-sólido (Agar ou outro produto), meio basal inorgânico (macro e micronutrientes), uma fonte de energia (sacarose) e frequentemente algum suplemento vitamínico. A utilização de auxinas e citocininas adicionadas às soluções nutritivas podem ser importantes na fase de estabelecimento da cultura. Tipicamente, o meio de cultura tem baixas concentrações de hormônios durante o estabelecimento em comparação com o estágio de multiplicação (Hartmann *et al.* 2002).

O início dos estudos a respeito das formulações nutritivas data da década de 1930. Nessa época já se conhecia a auxina que era utilizada em alguns experimentos. Na década de 1940 foram adicionadas sacarose e vitaminas como suplementos orgânicos. Já em 1951 foi realizada uma revisão dos meios nutritivos e a ênfase dos trabalhos concentrava-se na identificação de elementos essenciais para o crescimento de células e outros tecidos vegetais. Várias modificações surgiram de modo a estabelecerem um aumento nas concentrações dos sais em geral, uma diminuição de sódio e aumento de nitrogênio na forma de amônio para complementar a fonte na forma de nitrato (Caldas *et al.* 1999).

Em 1962, Murashige & Skoog, estabeleceram modificações nos meios de cultura originando a composição mais utilizada na propagação de diversos tecidos de diferentes espécies vegetais (Caldas *et al.* 1999). Foi desenvolvido a partir de exigências nutricionais do tabaco, é frequentemente utilizado em cultura de tecidos (Wawrosch *et al.* 1999, Dalal & Raí 2001, Rai & Thoyajaksha 2001, Kitaya *et al.* 2005 e Sharma *et al.* 2006), sendo também bastante comum no cultivo de bromélias (Mercier & Kerbauy 1997 e Souza *et al.* 2003). Entretanto, diluições dos macronutrientes desse meio podem ser mais adequadas ao cultivo *in vitro* de diversas espécies desta família (Mercier & Kerbauy 1997, Tamaki *et al.* 2007 e Kanashiro *et al.* 2007). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), diluições das formulações básicas têm, em geral, possibilitado melhor enraizamento, pois na presença de auxinas, altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente a de crescimento das raízes.

Além do meio de Murashige & Skoog (1962) (MS), o meio de Knudson (1946) tem sido também utilizado na consistência líquida ou geleificado em sua composição total ou reduzido pela metade. Meio nutritivo Knudson (1946) geleificado foi utilizado no cultivo de *Guzmania* sp, *Ananas erectifolius*, *Portea petropolitana* (Mapes 1973), *Guzmania ligulata*, *Tillandsia polystachia*, *Vriesea heliconioides*, *Vriesea splendens*, *Vriesea Meyers* (Mekers 1977), *Vriesea fosteriana* (Mercier &

Kerbaux 1992), *Dyckia macedoi* (Mercier & Kerbaux 1993), *Vriesea hieroglyphica* (Mercier & Kerbaux 1994, 1995) e *Tillandsia eizii* (Pickens *et al.* 2003). Knudson (1946) líquido foi utilizado na cultura de *Aechmea fasciata* e *Aechmea distichanta* (Zimmer & Pieper 1976), solução nutritiva MS completa líquida foi utilizada na propagação de *Aechmea fasciata* (Jones & Murashige 1974), *Cryptanthus bivittatus* (Davidson & Donnan 1977), *Quesnelia quesneliana*, *Vriesea poelmannii*, *Aechmea fasciata* (Hosoki & Asahira 1980), *Tillandsia cyanea* (Pierik & Sprenkels 1991) e *Cryptanthus sinuosus* (Arrabal *et al.* 2002). Em MS completo geleificado são cultivadas *Cryptanthus bromelioides* (Mathews & Rao 1982), *Puya tuberosa* (Varadarajan *et al.* 1993), *Aechmea fasciata* (Vinterhalter & Vinterhalter 1994), *Cryptanthus sinuosus* (Carneiro *et al.* 1998), *Dyckia distachya* (Pompelli & Guerra 2005), *Vriesea reitzii* (Rech-Filho *et al.* 2005) e *Ananas comosus* (Tamaki *et al.* 2007). Meio MS com metade das concentrações de macronutrientes foi utilizado pra cultivar *Ananas comosus* (Teng 1997), *Orthopytum mucugense* (Bellintani *et al.* 2007) e *Neoregelia mucugensis* (Bellintani *et al.* 2007 b).

Diluições dos macronutrientes do meio de Murashige & Skoog (1962) (MS) podem ser adequadas ao cultivo *in vitro* de diversas espécies de bromélias (Teng 1997, Bellintani *et al.* 2007, Tamaki *et al.* 2007, Kanashiro *et al.* 2007). Além disso, altas concentrações iônicas causadas pelo acúmulo de sais diminuem o potencial hídrico do meio de cultura resultando em uma menor disponibilidade de água para a planta.

Grossi (2000) recomenda que se determinem concentrações mínimas de macronutrientes para o cultivo de bromélias *in vitro*, de modo a proporcionar um melhor equilíbrio osmótico entre a planta e o meio de cultura e conseqüentemente obter-se um melhor desenvolvimento da mesma, pois em relação à *Aechmea nudicaulis*, a quantidade máxima absorvida de macronutrientes do meio MS ao longo de 5 meses não ultrapassou 70 % da concentração original utilizada no cultivo *in vitro* desta espécie.

Por se tratar de uma bromélia epífita de cerrado, *A. strobilacea* deve estar adaptada a ambientes oligotróficos, portanto há necessidade de se investigar o crescimento e o desenvolvimento de plantas em soluções mais diluídas. Uma vez estabelecido o melhor meio nutritivo, fatores abióticos que podem influenciar nas respostas morfológicas do explante devem ser considerados, como a luz por exemplo.

## Condições de luminosidade

A luz é um dos sinais ambientais que ao ser percebido desencadeia mudanças no metabolismo e desenvolvimento das plantas micropropagadas (Majerowicz & Peres 2007). Os efeitos da luz podem ser separados em relação ao impacto da irradiância luminosa (radiação fotossintética ativa), duração (fotoperíodo) e qualidade (comprimento de onda) no crescimento e desenvolvimento.

Em micropropagação a irradiância usada varia entre 40 e 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , entretanto a irradiância que incide no interior do frasco pode ser muito menor, pois a qualidade do vidro e o tipo de tampa utilizada para vedar os frascos podem reduzir a transmissão para o interior do frasco. Embora as espécies vegetais possuam necessidades variáveis de luz, esta escala é uma irradiância muito baixa quando comparadas com a de casa de vegetação que pode variar de 600 a 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Hartmann *et al.* 2002). As diferenças nas intensidades luminosas, dependendo da posição do frasco na prateleira na sala de cultura, podem também influenciar o desenvolvimento da planta (Grattapaglia & Machado 1999).

O fornecimento de luz da sala de cultura, onde normalmente as plantas permanecem durante o período de seu cultivo, deve ser controlado, pois os processos relacionados à fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo são dependentes de luz. Além disso, alta irradiância pode elevar a temperatura no interior dos frascos de cultivo e assim prejudicar o desenvolvimento das plantas (Pierik 1987).

Embora o uso de baixa irradiância no cultivo *in vitro* seja freqüente devido ao fato de se considerar que a fotossíntese de plantas cultivadas *in vitro* é limitada devido a uma baixa concentração de  $\text{CO}_2$  nos frascos, não é procedimento correto uma vez que no interior dos frascos de cultivo encontra-se  $\text{CO}_2$  em quantidade maiores do que se supõe (Pierik 1987).

Na ausência de luz, as plantas que têm um cotilédone seguem um programa de desenvolvimento caracterizado pelo estiolamento, onde o coleóptilo adquire o aspecto alongado e pálido devido à inibição da biossíntese de clorofilas e antocianinas. Sob exposição à luz, as plantas alteram o padrão de desenvolvimento (fotomorfogênese). Assim, o coleóptilo para rapidamente o alongamento e se torna mais espesso, o meristema apical é acionado, iniciando-se a biossíntese de clorofila e antocianina e as folhas começam a se desenvolver. Todo este processo ocorre pela exposição da planta ao estímulo luminoso e conseqüente transdução de sinais, em

segundos, pois as plantas dispõem de moléculas sensíveis a luz que determinam com precisão a qualidade, a quantidade e a duração da luz (Eckardt 2001).

Lee *et al.* (2007), com intuito de verificar a influência da quantidade e da qualidade da luz sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas de *Withania somnifera* cultivadas *in vitro*, observaram que esta espécie apresenta um grande crescimento sob intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em relação ao tamanho da parte aérea, da raiz, e massa fresca e seca. As plantas cultivadas sob intensidade de  $15$  e  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentaram pouco crescimento. Apesar do número de folhas ser o mesmo sob  $30$  e  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a área foliar foi maior nas plantas cultivadas em  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , houve um aumento progressivo nas concentrações de clorofilas e de carotenóides a  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , provavelmente relacionado à síntese destes pigmentos. O aumento na razão carotenóide/ clorofila simultaneamente ao aumento da intensidade luminosa é considerado uma medida protetora da planta contra a absorção excessiva de luz (Levitt 1980).

A influência da intensidade luminosa tem sido bem investigada em diversos trabalhos de plantas cultivadas *in vitro*, a ausência de luminosidade resulta em alongamento do caule em plantas de roseta sendo documentado por diversos autores como Kiss *et al.* (1995), Barboza & Caldas (2001) e Moreira *et al.* (2003). Radmann *et al.* (2001), estudando a influência da densidade do fluxo luminoso na multiplicação de *Gypsophila paniculata*, observaram que mesmo em condições de luminosidade as plantas apresentaram alongamento do seu eixo caulinar. Esses autores verificaram não existir diferenças significativas em relação ao número de entrenós, entretanto, as plantas submetidas a  $15,705 \text{ W.m}^{-2}$  de densidade de fluxo luminoso apresentaram maior comprimento dos entrenós em relação às plantas dos demais tratamentos que tinham maior intensidade ( $41,88$  e  $83,79 \text{ W.m}^{-2}$ ).

Plantas de *Catasetum fimbriatum*, cultivadas no escuro, apresentaram eixo caulinar alongado e aclorofilado, completa inibição da formação de raiz, e um aumento da massa seca em relação às plantas mantidas na luz (Suzuki & Kerbauy 2006). Nesse trabalho foi observada a influência da luz sobre hormônios endógenos, o conteúdo endógeno de citocinina e auxina nas partes aérea e radicular variaram significativamente sob condições de luminosidade. No escuro, o intenso crescimento da parte aérea coincide com um significativo acúmulo de citocinina endógena, cuja concentração foi duas vezes maior em relação à luz.

Alongamento do eixo caulinar na presença da luz foi observado em plantas de tabaco cultivada a partir de segmentos nodais sob irradiância de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

(Haisel *et al.* 2001) e também no cultivo de *Arabidopsis thaliana* a partir de segmentos nodais na irradiância de  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Smalle *et al.* 1997).

A intensidade luminosa utilizada na micropropagação de diversas espécies de bromélias varia de 10 a  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Teng 1997, Carneiro *et al.* 1999, Endres & Mercier 2001, Arrabal *et al.* 2002, Mercier *et al.* 2003, Pickens *et al.* 2003, Sripaoraya *et al.* 2003, Droste *et al.* 2005, Silva *et al.* 2005, Bellintani *et al.*, 2007, Silva *et al.* 2008 e Tavares *et al.*, 2008), exceção encontrada apenas no cultivo de *Tillandsia eizzi* cuja irradiância aplicada foi de  $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Pickens *et al.* 2003). Contudo a avaliação simultânea de diferentes intensidades luminosas durante o cultivo *in vitro* de bromélias não foi encontrada. Além da luz, o tipo de tampa utilizada nos frascos de cultivo permite acúmulo de gases na atmosfera interna dos frascos de cultura que podem influenciar no crescimento e desenvolvimento das plantas.

#### Vedação dos frascos

A produção de plantas *in vitro* é um sistema asséptico de modo a evitar que fungos e outros organismos se desenvolvam no meio nutritivo. Com intuito de proteger a cultura asséptica de infecções e para prevenir a dessecação tanto da planta quanto do meio de cultivo, as plantas são propagadas em frascos vedados, com restrição não intencional de trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco e o meio externo (Mensuali-Sodi, *et al.* 1992, Buddendorf-Joosten & Woltering 1994). Isso interfere na morfogênese de explantes de diversas espécies (Jackson *et al.* 1991, Nour & Torper 1994, Suzuki & Kerbauy 2006).

De acordo com Nour & Thorper (1994), o crescimento e a diferenciação das células vegetais *in vitro* são afetados por substâncias voláteis, resultado do metabolismo secundário das plantas que se acumulam no interior dos frascos de cultivo. Entre as substâncias voláteis produzidas pelos tecidos estão: etileno,  $\text{CO}_2$ , etano, acetaldeído, etanol e jasmonato, sendo que as repostas a estes diferentes gases são bastante variáveis em relação ao tecido cultivado.

Buddendorf-Joosten & Woltering (1994) citam que os fatores mais importantes que afetam o acúmulo de gases são: o tipo e a quantidade de material vegetal depositado no meio de cultura, as propriedades físicas dos frascos e a tampa, os componentes nutricionais do meio de cultivo e aspectos do macroclima (temperatura, ventilação e intensidade luminosa). A quantidade e a qualidade destes

gases podem variar em função do tipo de vedação que os frascos de cultura possuem, resultando num ambiente com maior ou menor acúmulo dessas substâncias no interior dos mesmos (Hartmann *et al.* 2002).

Buddendorf-Joosten & Woltering (1994) discutem a ocorrência de diferentes componentes gasosos nos frascos de cultivo *in vitro*, com especial ênfase nos efeitos dos diferentes gases que afetam o crescimento e desenvolvimento de explantes, como o etileno, dióxido de carbono e o oxigênio. Segundo esses autores, uma vantagem na diminuição da concentração de oxigênio na atmosfera do frasco de cultivo seria a inibição do crescimento de fungos e bactérias, considerados contaminantes do processo de transferência das plantas para condições *in vitro*, que podem inviabilizar o cultivo *in vitro* das plantas.

A concentração de dióxido de carbono no frasco altera devido à respiração e fotossíntese das plantas, portanto, no escuro, a concentração deste gás tende a aumentar devido a respiração, e durante o período de luz, esta concentração pode diminuir dependendo da atividade fotossintética da planta (Buckeridge *et al.* 2007). A concentração de etileno pode variar dependendo do tipo e do estado fisiológico do explante utilizado, da concentração ambiental deste gás durante a transferência do material vegetal e do tipo de tampa utilizada no frasco de cultivo (Buddendorf-Joosten & Woltering 1994).

Nour & Torper (1994) estudaram o efeito do tipo de tampa utilizado frasco e sua influência na fase gasosa sobre as respostas morfogênicas em explantes cultivados *in vitro* de *Thuja occidentalis*. Embriões desta planta foram cultivados em frascos que variavam em seu grau de troca gasosa, substâncias que reagem com o etileno retirando o mesmo da atmosfera do frasco e CO<sub>2</sub>.

Tem sido reconhecido por muito tempo que sem aeração adequada, as plantas cultivadas *in vitro* são alteradas devido a uma diminuição do influxo de oxigênio, resultando em uma diminuição na disponibilidade de dióxido de carbono externo privando os tecidos fotossintéticos deste gás limitando a produção de massa seca (Jackson *et al.* 1991).

A pequena movimentação do ar pode retardar as trocas gasosas entre as plantas e o ambiente do frasco de cultura, e conseqüentemente limitar o crescimento da planta, conforme comprovado por Kitaya *et al.* (2005), ao determinarem a influência de uma corrente de ar no aumento da fotossíntese das plantas de batata cultivadas *in vitro*.

Nour & Thorper (1994), examinaram o efeito da fase gasosa no frasco de cultivo tanto na indução de formação de gemas a partir de embriões quanto no desenvolvimento de gemas axilares a partir de brotos de cedro branco. Os explantes foram cultivados em placa de Petri vedada com filme de PVC, frascos de erlenmeyers com tampa de soro e com tampa de espuma, que permitem menor e maior troca gasosa entre a atmosfera interna e externa dos frascos de cultura respectivamente, foram observadas diferenças nas respostas dos tecidos em função dos diferentes tratamentos utilizados.

Jackson *et al.* (1991) descreveram como frascos de cultivo podem ser vedados de modo a proteger a cultura de contaminação e dessecação de modo que a falta de ventilação não afetasse o desenvolvimento da planta. Estes autores utilizaram diferentes vedações dos frascos de cultura para possibilitar níveis variáveis de ventilação em plantas micropropagadas de *Gerbera jamesonii*, *Ficus lyrata* e *Solanum tuberosum*. Entretanto foram observadas diferenças entre as espécies.

Bellintani *et al.* (2007) estudaram o efeito da ventilação *in vitro* na aclimação da bromélia *Orthophtum mucugense* através da vedação de tubos de ensaio contendo segmentos nodais, com filme de PVC e com algodão, os resultados mostraram que plantas provenientes dos tubos de ensaio fechados com algodão apresentaram 95,4% de sobrevivência e as plantas originárias dos tubos vedados com filme de PVC a taxa de sobrevivência foi de 80 %. Portanto estudos sobre o ambiente interno de cultivo de *A. strobilacea* são necessários de modo a otimizar o cultivo e a aclimação da espécie. Entretanto não foram encontrados trabalhos que avaliassem a influência dos gases sobre o alongamento do caule de bromélias cultivadas *in vitro*.

### Acúmulo de gases

As trocas gasosas entre o O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> do interior da planta e a atmosfera que a envolve interfere no metabolismo do carbono no interior da célula. Durante a fotossíntese a planta fixa CO<sub>2</sub> e libera O<sub>2</sub>, durante a respiração, a planta libera CO<sub>2</sub> e consome O<sub>2</sub>, revertendo assim, a troca destes gases (Larcher 2006).

A taxa respiratória varia de acordo com o tipo de órgão, idade, ambiente, estação, etc. Cada órgão respira independentemente, sendo que as raízes respiram intensamente, principalmente as primárias e jovens uma vez que apresentam meristemas em contínua atividade mitótica para formação de novas células que entrarão em processo de alongamento e desenvolvimento, necessitando de grande

quantidade de energia (Buckeridge *et al.* 2004). Geisler (1965) constatou que plantas de ervilha cultivadas sob aeração apresentavam maior comprimento e alongamento das raízes primárias em relação às plantas não aeradas, independente de um pré-tratamento de aeração.

São poucos os relatos sobre a influência da concentração de oxigênio no crescimento vegetal *in vitro*. O consumo de O<sub>2</sub> varia muito de espécie para espécie bem como entre cultivares (Righetti *et al.* 1990). Segundo Buddendorf-Joosten & Woltering (1994), uma vantagem na diminuição da concentração de O<sub>2</sub> na atmosfera do frasco de cultivo seria a inibição do crescimento de fungos e bactérias que podem inviabilizar o cultivo *in vitro* das plantas. Não foram encontradas referências sobre o acúmulo de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> nos frascos de cultivo de Bromeliaceae. Contudo, além destes gases, o etileno tem sido bastante estudado devido a sua relação com alterações morfológicas em diferentes espécies (Pérez-Bermúdez *et al.* 1985, Arigita *et al.* 2003).

## Etileno

O acúmulo de etileno pode alterar o fenótipo das plantas (Nour & Thorper 1994). Etileno é um fitorregulador que pode ser produzido pela semente em germinação ou pela própria planta que afeta o crescimento e o desenvolvimento de diferentes espécies de plantas cultivadas *in vitro*. Além da produção pela planta, outros fatores podem estar envolvidos como o agar utilizado como agente geleificante do meio de cultura que pode liberar uma quantidade considerável de etileno quando exposto à luz, podendo intensificar a quantidade de etileno acumulada no interior dos frascos de cultivo, como constatado por Mensuali-Sodi *et al.* (1992), cultivando lavanda (*Lavandula officinalis* x *Lavandula latifolia*).

O etileno é produzido a partir da conversão do aminoácido metionina a S-adenosil metionina, posteriormente convertido a aminociclopropano (ACC) através da ação da enzima ACC sintase, e o ACC dá origem ao etileno por ação da enzima ACC oxidase. Os tecidos meristemáticos e as regiões nodais geralmente apresentam uma produção elevada desse gás, também observada durante a abscisão de folhas, senescência de flores e o amadurecimento de frutos (Colli 2007).

Concentrações de etileno são freqüentemente abordados no estudo das respostas de crescimento e desenvolvimento de plantas submetidas a diferentes situações de estresse. Contudo é muito difícil demonstrar a especificidade de seus efeitos (Hall & Smith 1995). O efeito da aplicação exógena de etileno nas respostas

morfogenéticas das plantas pode ser estudado através da adição de precursores, como o ACC, de inibidores da biossíntese, através da adição de substâncias que são capazes de liberar o etileno, criando uma atmosfera enriquecida com este fitorregulador ou ainda pela eliminação do etileno utilizando a técnica de ventilação forçada (Arigita *et al* 2002) o que permite uma renovação do ar no interior dos frascos de cultivo. Outro modo de se estudar a ação do etileno na morfogênese é através do uso de bloqueadores específicos dos receptores de etileno, como por exemplo, o 1-metilciclopropeno (1MCP).

Locke *et al.* (2000) verificaram que devido a adição do precursor de etileno ACC (aminociclopropano) no meio de cultura houve um aumento no crescimento da parte aérea e diminuição da raiz em plantas de soja. O etileno pode interagir com outros hormônios como verificado para hipocótilos de *Digitalis obscura* cultivados *in vitro* (Pérez-Bermúdez *et al.* 1985) e em rizoma de *Kohleria eriantha* (Almeida *et al.* 2005).

Suzuki & Kerbauy (2006), observaram que em plantas de *Catsetum fimbriatum* cultivadas *in vitro* na presença de luz e tratadas com etileno houve uma forte redução do tamanho dos brotos, crescimento foliar, e crescimento radicular. Como fenótipo observado no crescimento foliar foi o mesmo observado com outros gêneros de orquídeas quando cultivadas em frascos pouco ventilados, estes autores atribuíram este fato ao provável acúmulo de etileno.

Buddendorf-Joosten & Woltering (1994) verificaram que o etileno suprime a dominância apical em bromélias cultivadas *in vitro*. Esse efeito causa um aumento do número de brotos axilares formados pelas plantas. Smalle *et al.* (1997) constataram que etileno tem um efeito promotor no alongamento do eixo caulinar de *Arabidopsis thaliana* quando cultivadas *in vitro* na presença de luz. Não foram encontrados trabalhos onde houvesse a verificação da influência desse gás no alongamento de bromélias cultivadas *in vitro*.

#### Transferência das plantas produzidas *in vitro* para cultivo em casa de vegetação

A produção de plantas ornamentais por meio do cultivo *in vitro* envolve a aclimação das plantas às condições *ex vitro*. Essa etapa de transplântio é caracterizada pela adaptação da planta às condições ambientais antes da transferência para o campo (Torres *et al.* 1999). Essa passagem é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação. Isto se deve basicamente

aos seguintes fatores: transferência das plantas de uma situação de reduzido fluxo respiratório, devido à baixa intensidade de luz e elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, tornando-as susceptíveis ao estresse hídrico; passagem da existência heterotrófica, a qual depende de um suprimento externo de energia (sacarose no meio de cultura), para um estado autotrófico, no qual as plantas devem realizar fotossíntese para sobreviver; transferência de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes no meio de cultura para outra onde é necessário incrementar a absorção de sais; mudança da planta de um ambiente asséptico para outro onde está sujeita ao ataque de microorganismos saprófitos e, eventualmente, patogênicos (Torres *et al.* 1999).

O fornecimento de adubação adequada às plantas recém transferidas é importante para seu desenvolvimento de maneira semelhante ao que ocorria quando estava em condições de cultivo *in vitro*. Entretanto, a maioria dos trabalhos referentes à aclimação de plantas produzidas *in vitro* não abordam os aspectos nutricionais, como observado no trabalho de Chen *et al.* (2006) que não descreveram o método de adubação das plantas de *Bupleurum kaoi* (planta medicinal ameaçada de extinção) recém transferidas da condição *in vitro* para casa de vegetação. O mesmo foi observado no trabalho de Preece & West (2006), que estabeleceram um protocolo de produção em casa de vegetação de *Hibiscus moscheutos*, testando apenas a profundidade do material vegetal no substrato, a umidade do ambiente e pré-tratamento de luz, sem mencionar se houve ou não fornecimento de nutrientes. Todavia é comum os relatos sobre o uso de fertilizantes comerciais, como no trabalho de Valero-Aracama *et al.* (2007), que aplicou adubo comercial Peters nas proporções 20N-20P-20K, em plantas de *Uniola paniculata* produzidas *in vitro* durante o processo de aclimação.

Benzing (2000) relata que os membros de Bromeliaceae desenvolveram adaptações para sobreviver em ambientes com baixa disponibilidade nutricional indicando que soluções comerciais muito concentradas podem não ser adequadas ao crescimento dessas plantas *ex vitro*. A adubação ideal para as bromélias pode considerar a disponibilidade de nutrientes no ambiente natural de muitas espécies da família.

## PROPOSTA PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO

*Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch (figura 1) é uma espécie com grandes atributos ornamentais que se caracteriza por apresentar folhas finas e acanaladas. Possui inflorescência que varia do vermelho ao laranja, na forma de um cone, se assemelhando ao estróbilo de uma conífera, o que deu origem ao seu nome específico (Reitz, 1983). Lawn (2008) recomenda o uso dessas plantas em cestos suspensos, pois suas folhas podem atingir 2 metros de comprimento (figura 2). Alguns exemplares podem ser encontrados à venda na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP). Na Espanha esta espécie é considerada uma planta ornamental, indicando seu valor para exportação. Apesar de ser uma espécie de ampla distribuição no Brasil, faz parte da lista vermelha de espécies da fauna e flora do Paraguai sob Resolução nº 524/06 março/2006 categorizada como uma espécie vulnerável, que segundo a IUCN (International Union for Conservation of Nature) significa que a população desta espécie está sofrendo um declínio cujo futuro é incerto.

Apesar do seu valor ornamental, poucos são os relatos sobre a produção dessa espécie para atender ao mercado de plantas ornamentais. Figueiredo (2003) estabeleceu o cultivo desta espécie por meio da utilização de diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Portanto, o desenvolvimento de protocolos que objetivem a produção é necessário para disponibilizá-la em maior número no mercado de ornamentais. Indiretamente, isso contribui para a redução da procura por exemplares retirados da natureza, contribuindo para a preservação da espécie.

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado como instrumento de conservação de bromélias devido à produção de conhecimento sobre suas características fisiológicas e necessidades nutricionais, além de outros aspectos do desenvolvimento das espécies desse grupo (Pierik & Sprenkels 1991, Mercier & Kerbauy 1992, Guerra *et al.* 1999, Grossi 2000, Nievola *et al.* 2001, Mercier & Nievola 2003, Tamaki 2003, Carneiro & Mansur 2004, Kanashiro 2005 e Barboza *et al.* 2006). Muitos estudos foram realizados visando à micropropagação de bromélias de interesse comercial e também das bromélias endêmicas, raras e/ou ameaçadas de extinção (Mercier & Kerbauy 1993, Mercier & Kerbauy 1995, Mercier & Kerbauy 1997, Naves 2001, Arrabal *et al.* 2002, Rodrigues *et al.* 2004 e Rech-Filho 2005). As vantagens oferecidas por este método de multiplicação de plantas são inúmeras, pois existe a

possibilidade de se obter um grande número de plantas em um curto espaço de tempo, com qualidade fitossanitária, o que não ocorre em ambiente natural (Mercier & Kerbauy 1995 e Carneiro & Mansur 2004).

Quando o objetivo da multiplicação de plantas é a preservação do patrimônio genético de uma dada espécie, a micropropagação deve ser iniciada por meio da cultura *in vitro* de sementes (Mercier & Nievola 2003). No caso de plantas de *A. strobilacea*, estas produzem poucas sementes e são difíceis de serem encontradas em seu ambiente natural, pois servem de alimento para a avifauna. Portanto, o desenvolvimento de estratégias de propagação alternativas ao uso de sementes torna-se desejável. Contudo a utilização de explantes oriundos de plantas já estabelecidas *in vitro* é mais adequada à obtenção de explantes de plantas do ambiente natural como meristemas, estolões, rizoma, pois a porcentagem de contaminação é menor. Assim, o cultivo *in vitro* dessa espécie deve ser iniciado a partir de sementes, podendo ser avaliada a possibilidade de utilização de outras fontes de explantes, a fim de otimizar a produção *in vitro*.

Trabalhos desenvolvidos na Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica mostraram que o estabelecimento de *A. strobilacea in vitro* requer condições especiais, pois as sementes possuem mucilagem (figura 3) facilitando o desenvolvimento de fungos e a contaminação do meio de cultura. As tentativas para o estabelecimento do cultivo *in vitro* dessa espécie por meio da utilização de protocolos convencionais de desinfestação de sementes ofereceram apenas 20 % de sementes não contaminadas. Estas, quando germinadas originavam plantas que apresentavam o eixo caulinar alongado e outras que cresciam sem apresentar este alongamento, à semelhança de outras bromélias, denotando uma não uniformidade das plantas produzidas (experimentos prévios). Portanto, embora fosse possível estabelecer o cultivo *in vitro* dessa espécie, o número e o aspecto das plantas produzidas não correspondia a um eficiente protocolo de cultivo *in vitro* para essa bromélia.

Vale ressaltar que o aspecto alongado ocorreu somente quando as sementes foram cultivadas *in vitro*. Experimentos preliminares mostraram que sementes de plantas de *A. strobilacea* cultivadas em gerbox contendo substrato casca de *Pinus*, nas mesmas condições de temperatura e luz que outras cultivadas *in vitro*, não originavam plantas que apresentavam o alongamento do caule (figura 4).

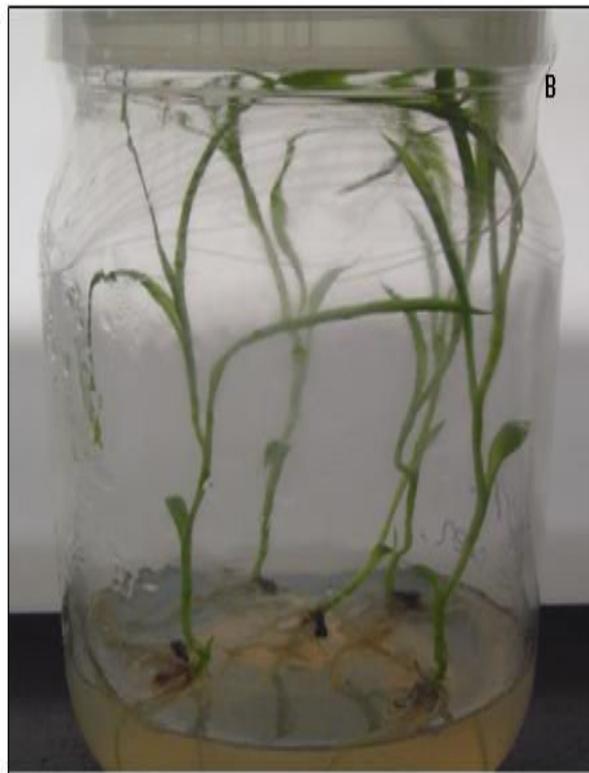


Figura 4. Plantas de *A. strobilacea* com três meses de idade (A) não alongadas cultivadas em bandejas plásticas com casaca de pinus e (B) plantas alongadas cultivadas *in vitro* a partir de sementes sob temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

Portanto, é possível supor que a condição do cultivo *in vitro* tenha sido a principal responsável pela ocorrência desse fenótipo. Joyce *et al.* (2003) relataram vários fatores responsáveis por alterações morfológicas *in vitro* em comparação às plantas crescidas em casa de vegetação.

O aspecto alongado do caule de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* culminou na hipótese relacionada à possibilidade de utilizar os segmentos nodais provenientes das plantas alongadas para a micropropagação dessa espécie. Assim, com base na literatura que apresenta a possibilidade de utilização desses explantes isolados para a produção de plantas (Kiss, *et al.* 1995, Mercier & Nievola 2003, Souza *et al.* 2003 e Mendes *et al.* 2007), este trabalho procurou estabelecer um protocolo de micropropagação da espécie por meio do estabelecimento inicial do cultivo via sementes e posterior investigação da possibilidade de utilização dos segmentos nodais como explantes. Para isto, houve a necessidade de melhorar o processo de desinfestação e estudar os fatores que poderiam estar relacionados ao alongamento do eixo caulinar das plantas de *A. strobilacea*.

## OBJETIVOS

Este trabalho objetivou aprimorar a metodologia de propagação *in vitro* de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch, estabelecendo a melhor condição de crescimento das plantas visando à produção destas em casa de vegetação. Paralelamente investigou-se o efeito do etileno no alongamento caulinar que essa espécie apresenta quando cultivada *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Almeida, A.B.W., Santana, G.S., Pinheiro, M.R. & Costa, M.A.P.C.** 2002. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24 (2): 296-300.

**Almeida, J.A.S., Kasheres, C. & Pereira, M.F.D.A.** 2005. Ethylene and abscisic acid in the control of development of the rhizome of *Kohleria eriantha* (Benth.) Hanst. (Gesneriaceae). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 (4): 391-399.

**Arigita, L., Tamés, R.S. & Gonzáles, A.** 2002. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiology Plantarum* 115: 166-173.

**Arigita, L., Tamés, R.S. & Gonzáles, A.** 2003. 1-Methylcyclopropeno and ethylene as regulators on *in vitro* organogenesis in Kiwi explants. *Plant Growth Regulation* 40: 59-64.

**Arrabal, R., Amancio, F., Carneiro, L.A., Neves, L.J. & Mansur, E.** 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation* 11: 1081-1089.

**Arruda, S.C.C., Souza, G.M., Almeida, M. & Gonçalves, A.N.** 2000. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 143-154.

**Barboza, S.B.S.C. & Caldas, L.S.** 2001. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52<sup>(1)</sup>. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36(3): 417-423.

**Barboza, S.B.S.C., Ribeiro, D.G., Teixeira, J.B., Portes, T.A. & Souza, L.A.** 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41 (2): 185-194.

**Bellintani, M.C., Lima, C.C., Brito, A.L., Santana, J.R.F. & Dornelles, A.L.C.** 2007. Estabelecimento *in vitro* de *Orthopytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia – Brasil. Revista Brasileira de Biociências 5 (2): 1101-1103.

**Benzing, D.H. & Renfrow, A.** 1974. The mineral nutrition of Bromeliaceae. Botanical Gazette 135(4): 281-288.

**Benzing, D.H.** 1980. The biology of the bromeliads. Mad River Press, Eureka, Calif.

**Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K.

**Buddendorf-Josten, J.M.C. & Woltering, E.J.** 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. Plant Growth Regulation 15: 1-16.

**Buckeridge, M.S, Tiné, M.A.S, Minhoto, M.J. & Lima, D.U.** 2004. Respiração. In: Barbante, G.B. Fisiologia vegetal. Editora Guanabara Koogan. 1ª edição 198-207.

**Caldas, L.S., Haridasan, P. & Ferreira, M.E.** 1999. Meios nutritivos. In: Torres, A.C., Caldas, L.S, & Buso, J.A. 1999. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia. V.2. Embrapa.

**Carneiro, L.A., Cândido, M.S.D., Araujo, R.F.G., Fonseca, M.H.P.B., Crocomo, O.J. & Mansur, E.** 1998. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae from Rio de Janeiro, Brazil. Plant Tissue Culture and Biotechnology 4: 153-158.

**Carneiro, L.A., Araújo, R.F.G., Brito, G.J.M., Fonseca, M.H.P.B., Costa, A., Crocomo, O.J. & Mansur, E.** 1999. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55: 79-83.

**Carneiro, L.A. & Mansur, E.** 2004. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidália* 2 (1): 12-20.

**Chen, U.C., Hsia, C.N., Yeh, M.S., Agrawal, D.C. & Tsay, H. S.** 2006. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi* – an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 42: 128-133.

**Cid, L.P.B.** 2001. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 19: 16-21.

**Coli, S.** 2004. Etileno. In: Kerbauy, G.B. *Fisiologia vegetal*. Editora Guanabara Koogan. 1ª edição. 308-332.

**Corbineau, F. Engelmann, F. & Côme, D.** 1990. Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Plant Science*. 71: 29-34.

**Dalal, N.V. & Raí, R.V.** 2001. *In vitro* propagation of *Ochreinauclea missionis* (Wall. Ex. G. Don), an ethnomedical endemic and threatened tree. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 37: 820-823.

**Davidson, S.E. & Donnan, A.** 1977. *In vitro* propagation of *Cryptanthus* spp. *Proc Fl State Hort Soc* 90: 303-304.

**Dittrich, V.A.O., Kozera, C. & Menezes-Silva, S.** 1999. Levantamento florístico dos epífitos vasculares do Parque Barigüi, Curitiba, Paraná, Brasil. *Iheringia* 52: 11-21.

**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* 48 (5): 717-722.

**Eckardt, N.A.** 2001. From Darkness into Light: Factors Controlling Photomorphogenesis. *The plant Cell*. 13: 219-221.

**Endres, L. & Mercier, H.** 2001. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition* 24 (1): 29-42.

**Faustino, T.C. & Machado, C.G.** 2006. Frugivoria por aves em uma área de campo rupestre na Chapada Diamantina, BA. *Revista Brasileira de Ornitologia* 14 (2): 137-143.

**Ferri, M.G., Menezes, N.L. & Scanavacca, W.R.M.** 1969. Glossário de termos botânicos. Editora Edgard Blücher Ltda.

**Figueiredo, M.L.** 2003. Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de Bromeliaceae nativas do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

**Fonseca, M.H.P.B., Carneiro, L.A., Araújo, R.F.G., Brito, G.J.M., Costa, A., Crocomo, O.J. & Mansur, E.** 1999. *In vitro* regeneration from leaf explant of *Neoregelia cruenta* (R.Graham) L.B. Smith, and endemic bromeliaceae species from eastern Brazil. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* 55: 79-83.

**Geisler, G.** 1965. The morphogenetic effect of oxygen on roots. *Plant physiology* 40 (1): 85 – 88.

**Gomes, F. & Canhoto, J.M.** 2003. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining gum). *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 39: 316-321.

**Gonçalves, C.N. & Waechter, P.** 2003. Aspectos florísticos e ecológicos de epífitos vasculares sobre figueiras isoladas no norte da planície costeira do Rio Grande do Sul. *Acta Botânica Brasílica* 17 (1): 89-100.

**Grattapaglia, D., Machado, M. A.** 1998. Micropropagação. *in*: Torres, A. C., Caldas, L. S. & Buso, J. A. orgs. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/ CBAB 1: 183-206.

**Grossi, F.** 2000. Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia. Tese – Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.

**Guerra, M.P., Dal Vesco, L.L., Pescador, R., Schuelter, A.R. & Nodari, R.O.** 1999. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34 (9): 1557-1563.

**Haisel, D., Hofman, P., Vagner, P., Lipavská, H., Tichá, I., Schäfer, C. & Capcová, V.** 2001. *Ex vitro* phenotype stability is affected by *in vitro* cultivation. Biologia Plantarum 44 (3): 321-324.

**Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davis Junior, F.T. & Geneve, R.L.** 2002. Plant propagation: Principles and Practices 7 ed. New York, Englewood Clippis.

**Hosoki, T. & Asahira, T.** 1980. *In vitro* propagation of bromeliads in liquide culture. Hortscience 15: 603-604.

**Jackson, M.B., Abbott, A.J., Belcher, A.R., Hall, K.C., Butler, R. & Cameron, J.** 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. Annals of Botany 67: 229-237.

**Jones, J.B. & Murashige, T.** 1974. Tissue propagation of *Aechmea fasciata* and other bromeliads. Proc Int Plant Propagators Soc 24: 117-126.

**Joyce, S.M., Cassells, A.C. & Jain, M.** 2003. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 103-121.

**Kanashiro, S.** 2005. Nitrogenio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plantas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith *in vitro*. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz. Universidade de São Paulo.

- Kanashiro, S., Ribeiro, R.C.S., Gonçalves, A.N., Dias, C.T.S. & Jocys, T.** 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm. cultivada *in vitro*. *Hoehnea* 34 (1): 59-66.
- Kerbaudy, G.B.** 1997. Clonagem de Plantas *In vitro*: Uma Realidade. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 1: 30-33.
- Kiss, E., Kiss, J., Gyulai, G. & Heszky, L.E.** 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience* 30: 127-129.
- Kitaya, Y., Ohmura, Y., Kubota, C. & Kozai, T.** 2005. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 251-257.
- Knudson, L.** 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 15: 214-217.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia vegetal*. Editora Rima.
- Lawn, G.** 2008. Bromeliads in hanging baskets. *Bromeliaceae* 17 (3): 9-10.
- Lee, S., Tewari, R.K., Hahn, E. & Paek, K.** 2007. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult* 90: 141-151.
- Lenzi, M., Matos, J.Z. & Orth, A.I.** 2006. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var: *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Botânica Brasileira* 20 (2): 487-500.
- Levitt, J.** 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York. Vol. 2.

**Locke, J.M., Bryce, J.H., & Morris, P.C.** 2000. Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 51 (352): 1843-1849.

**Lommen, W.J.M. & Struik, P.C.** 1992. Influence of a single non-destructive harvest on potato plantlets grown for minituber production. *Journal Agricultural Science* 40: 21-41.

**Luther, H.E.** 2006. An alphabetical list of Bromeliad Binomials, 10<sup>th</sup> ed. The Bromeliad Society International, Sarasota.

**Majerowicz, N. & Peres, L.E.P.** 2007. Fotomorfogênese em plantas. In: Kerbaudy, G.B. *Fisiologia vegetal*. Guanabara Koogan.

**Mapes, M.O.** 1973. Tissue culture of bromeliads. *Combined Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 23: 47-55.

**Mathews, V.H. & Rao, P.S.** 1982. *In vitro* regeneration in lateral bud explant of *Cryptanthus bromelioides* var. *tricolor* M.B. Foster *Plant Cell Rep* 1: 108-110.

**Mekers, O.** 1977. *In vitro* propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Acta Horti* 78: 311-317.

**Mendes, G.C., Soares, C.Q.G., Braga, V.F., Pinto, L.C., Santana, R., Viccini, L.F. & Peixoto, P.H.P.** 2007. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 5 (2): 972-974.

**Mensuali-Sodi, A., Panizza, M. & Tognoni, F.** 1992. Quantification of ethylene losses in different container-seal systems and comparison of biotic and abiotic contributions to ethylene accumulation in cultured tissues. *Physiologia Plantarum* 84: 472-476.

**Mercier, H & Kerbaudy, G.B.** 1992. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 30: 247-249.

**Mercier, H & Kerbauy, G.B.** 1993. Micropropagation of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic Brazilian bromeliad. Botanic Gardens: Micropropagation News 1 (6): 70-72.

**Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1994. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. J. Bromeliad Soc 44: 120-124.

**Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1995. Importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. Selbyana 16 (2): 147-149.

**Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). Biotechnology in Agriculture and Forestry 40: 43-57.

**Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2003. Obtenção de bromélia *in vitro* como estratégia de preservação. Vidália 1 (1): 57-62.

**Mercier H, Souza, B.M, Kraus, J.E., Hamasaki, R.M. & Sotta, B.** 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. Braz. J. Plant Physiol 15 (2):107-112.

**Molina, R.V., Castelló, S., García-Luis, S. & Guardiola, J. L.** 2007. Light cytokinin interactions in shoot formation in epicotyl cuttings of Troyer citrange cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult. 89: 131-140.

**Moreira, M.A., Pasqual, M., Carvalho, J.G. & Fráguas, C.B.** 2003. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro CV. Pérola. Ciência Agrotecnica 27 (5): 1002-1006.

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

**Murashige, T.** 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review Plant Physiology 25: 135-166.

**Naves, V.C.** 2001. Propagação *in vitro* da bromélia imperila *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras.

**Nhut, D.T.** 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. Plant Cell Reports 17: 913-916.

**Nhut, D.T., Le, B.V., Fukai, S. Tanaka, M. & Van, T.T.** 2001. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regulation 33: 59-65.

**Nievola, C.C., Mercier, H. & Majerowicz, N.** 2001. Urea – A possible source of organic nitrogen for tank bromeliads. Bromélia 6 (1-4): 44-48.

**Nour, K.A. & Thorper, T.A.** 1994. The effect of the gaseous state on bud induction and shoot multiplication *in vitro* in eastern white cedar. Physiology Plantarum 90: 163-172.

**Pereira, T.S.** 1988. *Bromelioideae* (Bromeliaceae) morfologia do desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 29: 115-154.

**Pereira, J.E.S.; França, R.B.; Dantas, A.C.M.; Fortes, G.R.L.** 2005. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. Horticultura Brasileira. Brasília 23 (1): 86-89.

**Pereira, M.J.** 2006. Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *In vitro* Cellular & Developmental Biology Plant 42: 65-68.

**Pérez-Bermúdez, P., Cornejo, M.J. & Segura, J.** 1985. A morphogenetic role for ethylene in hypocotyl cultures of *Digitalis obscura* L. Plant Cell Reports 4: 188-190.

**Pickens, K.A., Affolter, J.M. & Wetzstein, H.Y.** 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. HortScience 38 (1): 101-104.

**Pickens, A.K, Wolf, J. Affolter, J.M. & Wetzstein, H.Y.** 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In vitro* Cellular & Developmental Biology Plant 42: 348-353.

**Pierik, R.L.M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

**Pierick, R.I.M. & Sprengels, P.A.** 1991. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. J. Bromeliad Soc 41: 9-12.

**Pompelli, M.F. & Guerra, M.G.** 2005. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. Crop Breeding and Applied Biotechnology 5:117-126.

**Preece, J.E. & West, T.P.** 2006. Greenhouse growth and acclimatization of encapsulated *Hibiscus moscheutos* nodal segments. Plant Cell Tissue and Organ Culture 87: 127-138.

**Puddephat, I.J., Alderson, P.G. & Wright, N.A.** 1997. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. Journal of experimental Botany 48 (309): 951-962.

**Radmann, E.B., Braga, E.J.B., Karan, M.A.L., Posada, M.A.C. & Peters, J.A.** 2001. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gysophila paniculata* L. Revista Brasileira de Agrociência 7 (3): 171-175.

**Raí, V.R. & Thoyajaksha** 2001. Micropropagation of *Paracautleya bhatii* Smith – a rare and endemic plant. Phytomorphology 51 (1): 87-89.

**Rech-Filho, A.R., Dal Vesco, L.L., Nodari, R.O. Lischka, R.W., Muller, C.V. & Guerra, M.P.** 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity e Conservation* 14: 1799 – 1808.

**Reitz, R.** 1983. Bromeliaceas e malária-bromélia endêmica. Itajaí. Flora Ilustrada Catarinense. Série 983.

**Righetti, B., Magnanini, E. & Facini, O.** 1990. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> evolution during *in vitro* *Prunus avium* shoot cultures. XXIIIrd International Horticultural Congress, Fienze, Italy. Abstract nr. 3115.

**Rodrigues, T.M., Paiva, P.D.O., Rodrigues, J.G.C., Ferreira, C.A. & Paiva, R.** 2004. Desenvolvimento de muda de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. *Ciência Agrotécnica* 28 (4): 757-763.

**Sarasan, V., Cripps, 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.

**Sazima, I, Buzato, S. and Sazima, M.** 1995. The saw-billed hermit *Ramphodon naevius* and its flowers in southeastern Brazilian *Journal of Ornithology* 136: 195-206.

**Sazima, M. & Sazima, I.** 1999. The perching bird *Coereba flaveola* as a co-pollinator of bromeliad flowers in southeastern Brazilian *Journal of Zoology* 77: 47-51.

**Schinor, E.H., Paoli, L.G., Azevedo, F.A., Filho, F.A.A.M. & Mendes, B.M.J.** 2006. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* SP. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28 (3): 463-466.

**Sharma, M.M., Jalootharia, D., Khanna, P. & Batra, A.** 2006. An efficient *in vitro* mass propagation of a medicinally potent plant species *Vitex negundo* L. via nodal segments. *Phytomorphology* 56: 35-39.

**Silva, A.L.L., Bisognin, D.A., Dornelles, E.B., Walter, J.M. & Franco, E.T.H.** 2004. Ensaio sobre o alongamento de brotos de *Dyckia maritima* Baker dispostos em agrupamentos – Bromeliaceae. *Caderno de pesquisa Ser. Bio.* 13 (2): 37-46.

**Silva, A.L., Franco, E.T.H., Bisognin, D.A., Dornelles, E.B. & Walter, J.M.** 2005. Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. *Revista Brasileira Agrociência* 11 (3): 369-371.

**Silva, A.L.L., Dornelles, E.B., Bisognin, D.A., Franco, E.T.H. & Horbach, M.A.** 2007. Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral – na extinction threatened bromeliad. *Iheringia* 62 (1-2): 39-43.

**Silva, A.L.L., Franco, E.T.H., Dornelles, E.B. & Gesing, J.P.A.** 2008. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. *Iheringia* 63 (1): 135-138.

**Siqueira Filho, J.A. & Machado, I.C.S.** 2001. Biologia reprodutiva de *Canistrum auratiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 15 (3): 427-443.

**Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J. Montagu, M.V & Straeten, V.D.D.** 1997. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Plant Natl Acad Sci* 94: 2756-2761.

**Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1974. Bromeliaceae (Pitcairnioideae). *Flora Neotropica* (monograph 14, part 1). Haffner Press, New York.

**Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1977. Bromeliaceae (Tillandsioideae). *Flora Neotropica* (monograph 14, part 2). Haffner Press, New York.

**Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1979. Bromeliaceae (Bromelioideae). Flora Neotropica (monograph 14, part 3). Haffner Press, New York.

**Souza, B.M., Kraus, J.E., Endres, L. & Mercier, H.** 2003. Relationships between endogenous hormonal level and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. Plant Physiology and Biochemistry 41: 733-739.

**Sripaoraya, S., Marchant, R., Power, B.J. & Davey, M.** 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In vitro* Cellular & Developmental Biology Plant 39: 450-454.

**Suzuki, R.M. & Kerbauy, G.B.** 2006. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Brazilian Journal of Plant Physiology 18 (3): 359-365.

**Tadesse, M., Lommen, W.J.M. & Struiki, P.C.** 2000. Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61: 59-67.

**Tamaki, V.** 2003. Metabolismo nitrogenado e sinalização entre raiz e parte aérea em *Ananas comosus*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo.

**Tamaki, V., Mercier, H. & Nievola, C. C.** 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. Hoehnea 34 (1): 69-73.

**Tavares, A.R., Giampaoli, P., Kanashiro, S., Aguiar, F.F.A. & Chu E.P.** 2008. Efeito da adubação foliar com KNO<sub>3</sub> na aclimatização de bromélia cultivada *in vitro*. Horticultura Brasileira. 26 (2): 175-179.

**Teng, W.L.** 1997. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. Plant Cell Reports 16: 454-457.

**Termignoni, R.R.** 2005. Cultura de tecidos vegetais. Ed. UFRGS.

**Thoyajaksha & Rai, V.R.** 2006. *In vitro* multiplication of *Amomum mcrostephanum* Baker – an endangered species. *Phytomorphology* 56 (1 e 2): 23-28.

**Tisserat, B.S.F., Vaughn & Silman, R.** 2002. Influence of modified oxygen and carbon dioxide atmospheres on mint and thyme plant growth, morphogenesis and secondary metabolism *in vitro*. *Plant Cell Rep* 20: 912 - 916.

**Torres, A.C., Caldas, L.S, & Buso, J.A.** 1999. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.2. Centro Brasileiro Argentino de Biotecologia. Embrapa.

**Valero-Aracama, C., Wilson, S.B., Kane, M.E. & Philman, N. L.** 2007. Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy – and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43: 237 – 246.

**Varadarajan, G.S., Varadarajan, U. & Locy, R.D.** 1993. Application of tissue culture techniques to maintain a rare species *Puya tuberosa*. *J. Bromeliad Soc* 43: 112-118.

**Vinterhalter, B. & Vinterhalter, D.** 1994. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. *Sci Hort* 57: 253-263.

**Visser, E. J. W. & Pierik, R.** 2007. Inhibition of root elongation by ethylene in wetland and non-wetland plant species and the impact of longitudinal ventilation. *Plant, Cell and Environment* 30: 31-38.

**Wawrosch, C., Maskay, N. & Kopp, B.** 1999. Micropropagation of the threatened Nepalese medicinal plant *Swertia chirata* Buch.-Ham. ex Wall. *Plant Cell Reports* 18: 997-1001.

**Zaffari, G.R., Peres, L.E.P., Teacenco, F.A. & Kerbaury, G.B.** 2002. Indole-3-acetic acid metabolism in normal and dwarf micropropagated banana plants (*Musa* spp. AAA). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14: 211-217.

**Zimmer, K. & Pieper, W.** 1976. Methods and problems of clonal propagation of bromeliads *in vitro*. Acta Hortic 64: 25-29.

## CAPÍTULO 1 - Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch.

### RESUMO

*Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch é uma bromélia epífita ou saxícola, que é utilizada como planta ornamental devido as suas características morfológicas. Embora seja possível encontrar exemplares dessa planta oferecidos no mercado de ornamentais, não existem relatos sobre sua produção. Espécies de bromélias têm sido produzidas por meio do cultivo *in vitro*. Tem sido considerado que essa técnica é adequada à seleção e à multiplicação de fenótipos de interesse com qualidade fitossanitária. É comum o estabelecimento das culturas utilizando sementes. Entretanto, as sementes de *A. strobilacea* apresentam uma mucilagem que as envolve, causando contaminação quando transferidas para meio de cultura, sendo necessário verificar a possibilidade de utilização de explante alternativo ao uso destas. Quando as sementes germinam em condições *in vitro*, cerca de 60 % das plantas produzidas apresentam um alongamento do caule, apontando para a possibilidade de utilização dos segmentos nodais como explantes. O objetivo deste trabalho foi aprimorar o estabelecimento do cultivo *in vitro* da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* por meio de sementes e segmentos nodais, visando à produção. Sementes de *A. strobilacea* foram coletadas de plantas existentes na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP. Foram utilizados 2 protocolos de desinfestação com uso de hipoclorito de sódio e ácido clorídrico. A fim de investigar a possibilidade de utilização de segmentos nodais como explantes foram estabelecidas condições que favorecessem o aparecimento de plantas alongadas, variando, por exemplo, a formulação do meio de cultura, utilizando a composição original do meio de Murashige & Skoog (1962) (MS) e várias diluições dos macronutrientes: diluídos a metade (MS/2), a um quinto (MS/5) e a um décimo (MS/10), sendo que a todos esses tratamentos *in vitro* foram adicionados os micronutrientes de MS na composição original, 2% de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, pH 5,8 (geleificado com 6 g L<sup>-1</sup> de Agar); a utilização de diferentes intensidades luminosas como 14 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 41 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 50 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e escuro contínuo, além da verificação da influência da posição do segmento nodal da planta matriz para regeneração de novas plantas. Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a temperatura de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (com exceção aos experimentos nos quais variavam as intensidades luminosas). As plantas alongadas e não alongadas foram transferidas para estufa, onde receberam soluções nutritivas correspondentes às mesmas diluições do meio MS. Os resultados mostraram que a

desinfestação mais eficiente das sementes foi obtida com hipoclorito de sódio, detergente e ácido clorídrico a 25 %. As plantas que apresentavam o maior alongamento do caule foram cultivadas na diluição MS/5, intensidade luminosa de  $14 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo provenientes de segmentos nodais isolados da região mediana e basal do caule da planta matriz. Os demais tratamentos originaram maior número de plantas não alongadas. Estas, ao serem transferidas para casa de vegetação apresentaram 100% de sobrevivência quando regadas com a solução nutritiva contendo a metade dos macronutrientes do meio MS. As demais plantas que apresentavam o alongamento do caule permaneceram em cultivo, constituindo um importante material para fornecimento de outros segmentos nodais utilizados como explantes, viabilizando a formação de clones. Por meio do protocolo de cultivo *in vitro* estabelecido neste trabalho, é possível obter-se a partir de uma única semente, após um ano, cerca de 15.000 plantas de *A. strobilacea* cultivadas em vasos.

## ABSTRACT

*Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch is an epiphyte or saxicolous bromeliad. Although possible to find this plant clones offered in the ornamental market, there aren't reports about its production. Bromeliad species has been produced by *in vitro* cultivation. It has been considered that this technique is suitable to obtain interesting phenotypes selection and with phytosanitary quality. It's common the cultivations establishment using seeds. However, *A. strobilacea* seeds presents a mucilage, causing contamination when transferred to nutrition solution *in vitro*, being necessary to verify the possibility of alternative explant. When seeds germinates in *in vitro* conditions, about 60% of the plants produced presents a stem elongation, showed to the possibility of using the nodal segments a explants. The objective of this work was to aprimored the ornamental bromeliad *A. strobilacea in vitro* establishment by seeds and nodal segments, aim at production. *A. strobilacea* seeds were collected from existents plants at the Mogi-Guaçu Biological Reserve and Experimental Station at São Paulo. It were used 2 disinfection protocols, using sodium hypochlorite and chloridric acid. To investigate the possibility of nodal segments utilization like explants it were established conditions whose would in the appearance of elongated plants like: nutrition solution cultivation, using the Murashige & Skoog (1962) (MS) original composition and many macronutrients dilutions: diluted at half (MS/2), at a fifth (MS/5) and at one tenth (MS/10). It were added to all these *in vitro* treatments the MS micronutrients in the original composition, 2% of saccharose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of myo-inositol and  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  of thiamine, pH 5,8 (gelled with  $6 \text{ g L}^{-1}$  of Agar); the utilization of different light intensities  $14 \mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ , 41

$\mu\text{M m}^{-1} \text{ s}^{-2}$  e  $50 \mu\text{M m}^{-1} \text{ s}^{-2}$  and continuous dark, besides the verification of the influence of the nodal segment position at the originated from that plants production. All the treatments were kept in growth rooms at  $26 \pm 2$  °C temperature, photoperiod of 12 hours and irradiance of  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (except the experiments in whose the light intensities changed). The elongated and not elongated plants were transferred to the greenhouse, where they received nutritious solutions corresponding to the same MS macronutrient dilutions. The results showed that the best seed disinfestation was obtained with sodium hypochlorite, detergent and chloridric acid at 25%. The plants whose presented the large stem elongation were cultivated in the MS/5 dilution, light intensity of  $14 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , being from the isolated nodal segments from median and basal regions in the plant stem. The other treatments originated high number of not elongated plants. When these ones were transferred to the greenhouse presented 100% of survival when irrigated with the nutritious solution containing half of the macronutrients of MS solution. The plants that presented the stem elongation were kept in cultivation, becoming an important material for the other nodal segments supplying like explants, making it possible the formation of clones. Through the *in vitro* cultivation protocol established in this work, its possible to obtain from only one seed, after one year, about 15.000 *A. strobilacea* plants cultivated in flower-pots.

## INTRODUÇÃO

*Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch é uma bromélia epífita ou saxícola, de folhas finas e acanaladas contendo tricomas ao longo da lâmina foliar. Possui o escapo floral verde com inflorescências avermelhadas em forma de cone, sendo utilizada como planta ornamental (Reitz 1983, Figueiredo 2003 e Lawn 2008). O extrativismo das árvores que servem de suporte para esta espécie em seu ambiente natural resultou em uma drástica redução da população de *A. strobilacea* (Figueiredo 2003). Embora existam exemplares sendo comercializados, não foram encontradas referências sobre a produção comercial dessa espécie. O desenvolvimento de protocolos que visem à produção dessa espécie pode contribuir para aumentar o fornecimento de exemplares para o mercado interno, contribuindo para a diminuição do extrativismo.

O cultivo *in vitro* de bromélias tem sido considerado uma importante técnica para otimizar a produção dessas plantas de modo a atender o mercado de ornamentais, pois permite a seleção e a multiplicação de fenótipo de interesse com qualidade fitossanitária (Arrabal *et al.* 2002, Mercier & Nievola 2003 e Rech-Filho *et al.* 2005). Vários estudos têm sido realizados visando ao cultivo *in vitro* de bromélias de interesse comercial e também das bromélias endêmicas, raras e/ou ameaçadas de extinção (Arrabal *et al.* 2002, Rodrigues *et al.* 2004 e Rech-Filho *et al.* 2005).

Em muitos deles o estabelecimento do cultivo é iniciado a partir de sementes. Entretanto, a presença de mucilagem envolvendo as sementes pode causar contaminação como é o caso de *A. nudicaulis* (Grossi 2000). *A. strobilacea* também possui mucilagem envolvendo as sementes. A presença de mucilagem pode relacionar-se ao tipo de dispersão das sementes, por aves (Figueiredo 2003). Muitas espécies de Bromeliaceae possuem síndrome de dispersão por endozoocoria, em que o animal ingere o fruto e em seguida elimina o diásporo (Dittrich *et al.* 1999). Faustino e Machado (2006) observaram a ave *Schistoclamys ruficapillus* alimentando-se do fruto inteiro da bromélia *Hohenbergia ramageana*. *Pipra rubrocapilla* (Pipridae) e *Tangara faustuosa* (Thraupinae) foram observados dispersando os frutos de *Canistrum aurantiacum* (Siqueira Filho & Machado 2001). *Aechmea nudicaulis*, também é citada como espécie ornitocórica no trabalho de Gonçalves & Waechter (2003). Os frutos e sementes de *Aechmea lindenii* são dispersos por pássaros das famílias Thraupidae e Pipridae, segundo trabalho realizado por Lenzi *et al.* (2006).

Portanto, devido ao fato de serem utilizados pela fauna aliado à baixa produção de sementes (Figueiredo 2003), há necessidade de investigar outro modo de produção dessa espécie.

O estabelecimento do cultivo *in vitro* a partir de sementes ou de tecidos de plantas provenientes do campo ou casa de vegetação requer a eliminação de microorganismos do material para que não haja crescimento destes no interior do frasco. A desinfestação superficial mais utilizada para sementes de Bromeliaceae tem sido a submersão destas em solução diluída (1-20%) de hipoclorito de sódio, adicionado de algumas gotas de Tween 20<sup>®</sup>, por diferentes tempos (5-30 min), seguidas de enxágue com água destilada esterilizada antes de serem transferidos para o meio de cultura (Mercier & Kerbauy 1997, Endres & Mercier 2001, Rech-Filho *et al.* 2005 e Silva *et al.* 2007). Entretanto as sementes de *A. strobilacea* são envoltas por uma mucilagem, de difícil remoção, responsável por facilitar o estabelecimento de microorganismos, o que deve ser considerado ao testar um protocolo para desinfestação das sementes dessa espécie. Grossi (2000) utilizou ácido clorídrico na desinfestação de *Aechmea nudicaulis*, cujas sementes são envoltas por mucilagem, e diminuiu a porcentagem de contaminações.

Além do processo de desinfestação, a seleção do meio de cultura mais adequado é importante para o estabelecimento do cultivo uma vez que pode ser um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas. O meio nutritivo formulado por Murashige & Skoog (1962) (MS) desenvolvido a partir das exigências nutricionais do tabaco, é frequentemente utilizado em cultura de tecidos, sendo também bastante comum no cultivo de bromélias (ver revisão em Mercier & Kerbauy 1997). Entretanto, diluições dos macronutrientes desse meio podem ser mais adequadas ao cultivo *in vitro* de diversas espécies desta família (Mercier & Kerbauy 1997; Tamaki *et al.* 2007; Kanashiro 2007).

Uma vez estabelecido o cultivo *in vitro* a partir de sementes, para muitas espécies é possível a micropropagação por meio da utilização de fragmentos das plantas mantidas em cultura, minimizando a contaminação, uma vez que o explante usado está em condições assépticas, como por exemplo, gemas axilares (Almeida *et al.* 2002, Silva *et al.* 2004), segmentos caulinares com uma ou mais gemas (Kiss *et al.* 1995, Mendes *et al.* 2007) e ainda segmentos foliares (Fonseca *et al.* 1999). Por meio dessa técnica é possível a obtenção de clones, o que é aconselhável quando o objetivo é a produção (Mercier & Kerbauy 1997), devido à possibilidade de homogeneizar o lote de plantas produzidas. Dentre os estudos, a maioria utiliza

reguladores de crescimento, porém, o uso destas substâncias tem sido associado à indução de variações somaclonais dos tecidos (Pierik 1987, Zaffari *et al.* 2002, Joyce *et al.* 2003). Tamaki *et al.* 2007, relataram não haver necessidade de fitorreguladores na produção de mudas de abacaxizeiro por meio de segmentos nodais provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, submetidas às condições de estiolamento, como a ausência de luminosidade, à semelhança do observado por Kiss *et al.* (1995), Barboza & Caldas (2001) e Moreira *et al.* (2003). Contudo tem sido demonstrado alongamento do caule associado a diferentes intensidades luminosas (Smalle *et al.* 1997, Haisel *et al.* 2001, Radmann *et al.* 2001). Para *A. strobilacea* não foram encontradas referências sobre a presença do alongamento do caule na presença de luz, situação necessária para o isolamento dos segmentos nodais.

Devido à presença de um gradiente basípeto de auxina ao longo do caule que vai permitir a expressão de potenciais morfogenéticos específicos, a regeneração de nós *in vitro* pode depender da posição que o explante ocupa no eixo caulinar da planta matriz (Termignoni 2005), como observado para batata (Pereira *et al.* 2005), *Quercus robur* (Puddephat *et al.* 1997) e *Citrus* (Schinor *et al.* 2006). Na espécie de bromélia *Ananas comosus* foi observado que há diferenças na regeneração dos segmentos nodais se estes forem provenientes de planta com o ápice ou sem o ápice, sendo que os primeiros originaram em nova planta em 15 dias e os outros não desenvolveram gema (Souza *et al.* 2003).

Uma vez regeneradas as plantas, a etapa seguinte que visa à produção é a retirada destas das condições *in vitro* para o crescimento em vasos, em casa de vegetação, sendo necessário o fornecimento de nutrientes, como descrito para *Bupleurum kanoi* (Chen *et al.* 2006) e *Hibiscus moscheutos* (Preece & West 2006), por exemplo. Frequentemente utilizam-se fertilizantes comerciais, como o adubo comercial Peter nas proporções 20N-20P-20K (Valero-Aracama *et al.* 2007) ou de soluções nutritivas em baixa concentração, em relação ao meio de cultura (Tadesse *et al.* 2000). Rech-Filho (2005), trabalhando com *Vriesea reitzii* utilizaram como substrato turfa mineral suplementada com N-4, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-14, K<sub>2</sub>O-8. Benzing (2000) relata que as bromélias desenvolveram adaptações para sobreviver em ambientes com baixa disponibilidade nutricional condição diferente daquela na qual são cultivados *in vitro*, indicando haver diferenças nas necessidades nutricionais das plantas, quando compara-se a condição *in vitro* com a *ex vitro*.

Figueiredo (2003) estabeleceu a micropropagação de *A. strobilacea* com uso de reguladores de crescimento. Entretanto, esse autor não documenta a porcentagem

de contaminação das sementes, o rendimento do protocolo além de mencionar a adubação das plantas quando transferidas para as condições *ex vitro*, dado importante para a produção da espécie.

O objetivo deste trabalho foi aprimorar o cultivo *in vitro* da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* a partir de sementes e desenvolver protocolo para a micropropagação dessa espécie a partir de segmentos nodais e posterior aclimação das plantas em casa de vegetação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de sementes

Sementes de *Acanthostachys strobilacea* foram coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP. Para evitar que as sementes fossem utilizadas pela avifauna, alguns frutos imaturos foram envolvidos por um tecido fino amarrado à planta por um fio metálico (figura 1). Assim que atingiram a maturidade, os frutos foram removidos e levados ao laboratório da Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo. As sementes foram retiradas dos frutos e depositadas em caixas do tipo gerbox, abertas, para diminuir a umidade da mucilagem que as envolve. Em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em geladeira a 10 °C até a montagem dos experimentos. As sementes permaneceram armazenadas por aproximadamente um ano.

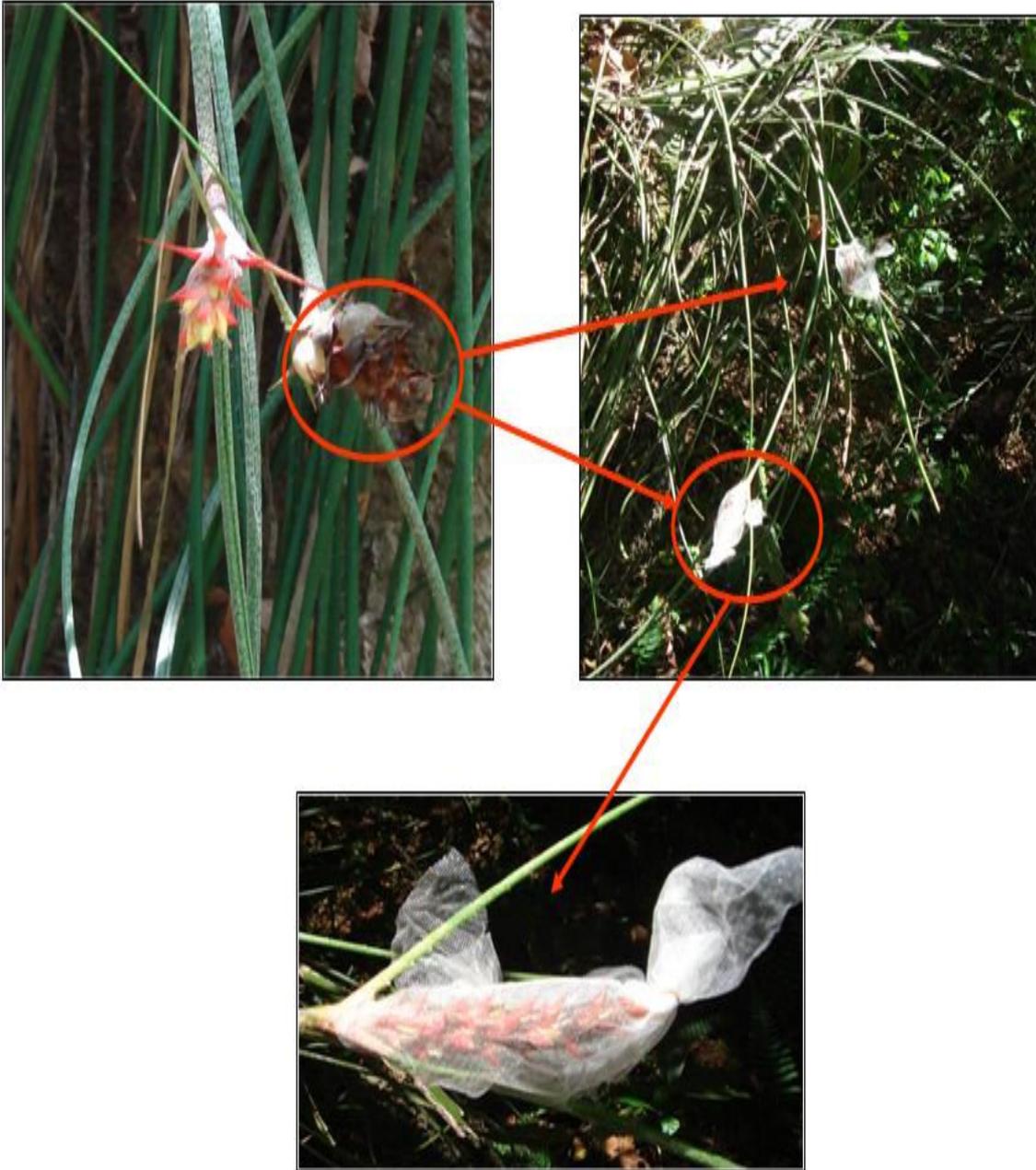


Figura 1. Aspecto do fruto de *A. strobilacea* envolvido com tecido para evitar a ingestão por pássaros.

## Estabelecimento do cultivo *in vitro* a partir de sementes

Sementes de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch, foram submetidas a dois protocolos de desinfestação: TH – 100 sementes foram imersas em etanol 70 % por 5 min; fungicida (Benomyl 0,1 %) por 15 min, e posteriormente com hipoclorito de sódio por 1 hora com 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup>, sendo mantidas sob agitação; TC - 100 sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial (2 % de cloro ativo) acrescido de 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup> mantidas sob agitação por 20 minutos. Foram então transferidas para uma solução aquosa de HCl (ácido clorídrico) a 25 % por 10 minutos. Após enxágue com água destilada, as sementes foram colocadas em etanol 70 % por 5 minutos, e em seguida em fungicida (Benomyl 0,1 %), por mais 15 minutos e posteriormente em hipoclorito de sódio comercial com 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup> por 1 hora sob agitação.

Para cada tratamento, as sementes foram distribuídas igualmente em 10 placas de Petri (10 sementes por placa) contendo 15 mL de solução de sacarose a 2 %, pH 5,8, geleificada com agar (6 g L<sup>-1</sup>), esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C. As placas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram<sup>®</sup>, super luz do dia 40 W). Após 20 dias foram calculadas a porcentagem de sementes não contaminadas e de emergência das plantas.

Assim que se estabeleceu o protocolo de desinfestação, foi avaliada a diluição ideal dos macronutrientes da solução de Murashige & Skoog (1962). Foram testadas 3 diluições: metade (MS/2), um quinto (MS/5) e um décimo (MS/10). A todos esses tratamentos foram adicionados micronutrientes de MS, 2% de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina. O pH foi de 5,8. Os meios foram geleificados (6 g L<sup>-1</sup> de Agar) e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Para cada tratamento utilizaram-se 5 frascos de vidro de 250 mL de capacidade com 40 mL de meio cada, com 5 sementes por frasco, por tratamento. Estes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram<sup>®</sup>, super luz do dia 40 W).

Após três meses, as plantas foram avaliadas quanto ao número de folhas e raízes, comprimento da raiz e massa fresca e seca das partes aérea e radicular. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 5

repetições, sendo cada repetição constituída de 5 explantes. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

#### Estabelecimento do cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodais

Inicialmente avaliou-se a influência da luz sobre o alongamento de *A. strobilacea* com o objetivo de obterem-se segmentos nodais isolados.

Sementes de *A. strobilacea* foram desinfestadas e transferidas para o meio de cultivo considerado mais adequado. Cinco frascos contendo 5 sementes cada foram colocados por três meses, em câmaras de germinação ajustadas para diferentes intensidades luminosas:  $14 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $36 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $50 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e escuro contínuo, todos sob temperatura de  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os parâmetros utilizados para a análise comparativa do crescimento e desenvolvimento dessas plantas foram: número de folhas e raízes por planta, tamanho da raiz, teores de massa fresca e seca das partes aérea e radicular e o número de segmentos nodais provenientes do eixo caulinar alongado das plantas. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por 5 plantas. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Com o objetivo de verificar a influência da posição do explante no eixo caulinar sobre o alongamento das plantas regeneradas, segmentos nodais provenientes de plantas com 60 dias de idade foram isolados e transferidos para o meio de cultura onde permaneceram.

Os segmentos nodais foram classificados em apical (o mais próximo à gema apical), basais (o mais próximo à base) e medianos, considerados aquele situado os outros dois. Cinco segmentos nodais correspondentes a cada uma das três posições foram transferidos para frasco de vidro de 250 ml de volume, fechados com tampa plástica e contendo 40 ml de meio nutritivo. Foram utilizados 5 frascos por tratamento contendo 5 explantes por frasco, mantidos em sala de cultura com  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luminosidade. Após 3 meses de cultivo foram avaliados o número de nós, folhas e raízes, tamanhos do caule e da raiz das plantas obtidas a partir do desenvolvimento das gemas laterais. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e as médias foram submetidas à análise de variância fator único, para comparação entre as médias, foi aplicado teste de Tukey com nível de significância de 5 %.

## Transferências das plantas de *A. strobilacea* para casa de vegetação

Plantas com 2 meses de idade, alongadas e não alongadas provenientes do desenvolvimento da gema lateral de segmentos nodais apicais, medianas e basais foram transferidas para condições *ex vitro*. Foram utilizadas 288 plantas, sendo a metade apresentando eixo caulinar alongado e a outra metade sem o alongamento do caule, distribuídas em 5 tratamentos dispostas em três blocos. Após serem retiradas dos frascos, as raízes foram lavadas em água corrente de modo a remover o meio de cultura, e transferidas para vasos plásticos com capacidade para 500 mL contendo substrato de casca de pinus fina, em casa de vegetação. Semanalmente, as plantas recebiam adubação que consistia de 50 mL por planta de solução de Murashige & Skoog (1962), composta por diferentes concentrações de macronutrientes: MS completo, MS/2, MS/5, MS/10, MS/100. No início do cultivo as plantas receberam doses semanais de solução a 1 % de benomyl (fungicida) no período de quatro semanas, e foram aplicadas duas doses de inseticida actara<sup>®</sup> (0,1 g/l). Após 8 meses de cultivo, as plantas foram avaliadas quanto ao número e tamanho de folhas, massas fresca e seca das partes aérea e radicular.

Para medir o comprimento do caule, as plantas tiveram suas folhas removidas e desconsideradas.

## RESULTADOS

### Desinfestação

A tabela 1 mostra os resultados do teste de desinfestação, onde as sementes de desinfestadas com álcool etílico e hipoclorito de sódio apresentaram uma taxa de contaminação de 40 %, contudo, o tratamento que incluiu a adição da solução a 25 % de ácido clorídrico propiciou uma redução nessa taxa, chegando a 3 %, o que mostrou ser esse o protocolo mais adequado para essa espécie. Observou-se que em ambos os tratamentos a porcentagem de germinação foi de 100%, e a emergência da plântula ocorreu em 8 dias.

Tabela 1 – Porcentagem de contaminação e germinação *in vitro* de sementes de *A. strobilacea* (n=10 com 5 repetições), após 20 dias de inoculação.

Respostas observadas	Método de desinfestação de sementes	
	Hipoclorito de sódio	Hipoclorito de sódio + Ácido clorídrico
% Sementes contaminadas	40	3
% Porcentagem de emergência da plântula	100	100

### Composição nutricional do meio de cultura

A tabela 2 mostra que as plantas cultivadas em MS completo e MS/5 apresentaram maiores números de folhas produzidas (15), quando comparadas aos meios MS/2 e MS/10 (12 e 11 unidades respectivamente). Em relação ao comprimento e número de raízes, não houve diferenças significativas entre os tratamentos MS/2 e MS/5 e MS. Entretanto, as plantas cultivadas em MS/10 apresentaram raízes em menor número e tamanho (5 raízes, de 11,68 cm de comprimento em média) em relação aos demais tratamentos.

O tratamento que induziu o maior número de segmentos nodais foi o MS/5 (tabela 2), mostrando ser esse o meio mais adequado à obtenção de plantas alongadas das quais pudesse se utilizar os nós como explantes. Apenas em relação ao número de nós que as plantas cultivadas nessa condição diferenciaram-se daquelas mantidas em MS completo. Para os demais parâmetros, quantidade de folhas, ao comprimento e número de raízes não houve diferenças significativas quando se adicionou a concentração original do meio de Murashige & Skoog (1962).

Tabela 2 – Parâmetros biométricos de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* a partir de sementes em diferentes diluições de macronutrientes do meio de Murashige & Skoog (1962).

Tratamentos	Número de folhas (un)	Número de nós (un)	Comprimento da raiz (cm)	Número de raiz (un)
MS completo	15 a	8 b	12,92 a	8 a
MS/2	12 b	4 c	14,94 a	6 ab
MS/5	15 a	14 a	11,42 a	6 ab
MS/10	11 c	6 c	11,68 a	5 b

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

A tabela 3 mostra que não foram observadas diferenças significativas no acúmulo de matéria fresca e seca da parte aérea de plantas de *A. strobilacea* quando cultivadas *in vitro* em qualquer das diluições de macronutrientes de MS utilizadas. É importante salientar que as amostras eram compostas pelo caule e folhas. Em relação

ao sistema radicular, apenas as plantas cultivadas no tratamento MS/10 é que apresentaram maior conteúdo de massa fresca. Para as plantas dos outros tratamentos não foram observadas diferenças significativas quanto às quantidades de massa fresca e seca das raízes.

Tabela 3 – Massa fresca e seca das partes aérea e radicular de plantas produzidas a partir de sementes de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com diferentes diluições de macronutrientes.

	Parte aérea		Raiz	
	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
MS	0,24 a	0,02 a	0,06 b	0,01 a
MS/2	0,24 a	0,02 a	0,07 b	0,01 a
MS/5	0,20 a	0,02 a	0,05 b	0,01 a
MS/10	0,19 a	0,01 a	0,14 a	0,01 a

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

Observou-se, portanto, que a diluição dos macronutrientes de MS à 1/5 possibilitou o desenvolvimento de *A. strobilacea* de maneira semelhante à utilização da composição original (MS completo), com a vantagem de que nessa diluição foi observado significativo número de segmentos nodais visíveis a olho nu, indicando ser essa a concentração que produz plantas das quais se pode utilizar o maior número possível de segmentos nodais como explantes para obtenção de novas plantas.

#### Intensidade luminosa

A figura 2 mostra plantas de *A. strobilacea* cultivadas no escuro contínuo a partir de sementes, apresentando aspecto estiolado, mantidas na intensidade de  $50 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , não sendo possível visualizar os segmentos nodais separados pelo entrenó, e na intensidade de  $14 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , onde as plantas apresentaram eixo caulinar alongado, sendo possível visualizar a olho nu cinco segmentos nodais.

A tabela 4 mostra os resultados de crescimento das plantas mantidas em diferentes intensidades luminosas. Somente foi possível observar o número de segmentos nodais nas plantas mantidas em  $14 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ou naquelas que permaneceram no escuro (número médio de 5 e 3 respectivamente). Entretanto, o maior comprimento do caule ocorreu nas plantas mantidas na ausência de luz. A menor intensidade luminosa induziu uma menor quantidade de folhas que os

tratamentos de luz mais intensa. As plantas mantidas no escuro tinham a menor quantidade de folhas que os demais tratamentos.

Os resultados mostram que a intensidade luminosa teve pouca influência no crescimento e desenvolvimento das raízes. Cada planta produziu cerca de 2 a 3 raízes (tabela 4), que variavam entre 12 e 13 centímetros. Contudo, as raízes cresceram menos nas plantas mantidas no escuro do que naquelas cultivadas na presença de luz.



Figura 2. *Acanthostachys strobilacea* cultivada *in vitro* sob temperatura de  $26 \pm 2$  °C, submetida ao (A) escuro contínuo, (B) intensidade de  $50 \mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$  sem alongamento caulinar e (C) intensidade de  $14 \mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ , apresentando alongamento do eixo caulinar.

Tabela 4 – Análise biométrica de plantas com 3 meses de idade produzidas a partir de sementes de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluído à um quinto por três meses, em diferentes condições de luminosidade em fotoperíodo de 12 horas.

	Número de folhas (un)	Comprimento do caule (cm)	Número de raiz (un)	Comprimento da raiz (cm)	Número de segmentos nodais (un)
Escuro contínuo	4 c	7,50 a	2 a	7,09 b	3 b
14 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$	9 b	5,50 b	2 a	12,51 a	5 a
41 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$	11 a	0,5 c	3 a	13,02 a	—
50 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$	11 a	0,5 b	3 a	13,05 a	—

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

A tabela 5 mostra que as plantas mantidas na ausência de luz apresentaram menores teores de massas fresca e seca tanto da parte aérea, quanto da raiz, seguidas daquelas cultivadas na intensidade luminosa baixa. As plantas mantidas nas 3 maiores intensidades luminosas 41 e 50  $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$  tinham mais massa fresca. Entretanto, comparando-se a massa seca da parte aérea das plantas cultivadas em condições de luminosidade, àquelas que cresceram sob menor intensidade (14  $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ), foram diferentes significativamente em relação àquelas cultivadas na maior intensidade (50  $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ), (0,019 g e 0,028 g, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas no acúmulo de massas fresca e seca da raiz nas intensidades luminosas de 41 e 50  $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ . Todavia, as plantas crescidas na menor intensidade luminosa tinham menos massa fresca e seca das raízes quando comparadas àquelas mantidas nas maiores intensidades. O tratamento que foi menos propício ao desenvolvimento das raízes das plantas foi o de ausência de luz.

Tabela 5 – Massa fresca e seca das partes aérea e radicular de plantas produzidas a partir de sementes de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluídos a um quinto por três meses, em diferentes condições de luminosidade em fotoperíodo de 12 horas.

	Parte aérea		Raiz	
	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Escuro contínuo	0,088 d	0,003 c	0,005 c	0,001 c
14 $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$	0,223 c	0,019 b	0,034 b	0,004 b
41 $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$	0,317 b	0,021 b	0,091 a	0,007 a
50 $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$	0,472 a	0,028 a	0,079 a	0,010 a

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

A tabela 4 mostra que ocorrem uma maior diferenciação na quantidade de segmentos nodais visíveis a olho nu nas plantas incubadas sob intensidade luminosa de  $14 \mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ . Esses dados foram quantificados e apresentados na forma de número médio de segmentos nodais por planta. Entretanto, observou-se que cerca de 10 % das plantas não alongaram. Este resultado sugere que outro fator esteja envolvido no alongamento caulinar além da intensidade luminosa. Os resultados do experimento de posição do nó, descritos a seguir, corroboraram essa hipótese.

#### Efeito da posição do nó

A tabela 6 mostra os resultados dos parâmetros biométricos de plantas regeneradas a partir de segmentos nodais provenientes de diferentes posições no eixo caulinar da planta matriz. Foi possível observar que a origem do nó influenciou no crescimento e desenvolvimento de *A. strobilacea*. Verificou-se que explantes originários das regiões mediana e basal do caule produziram plantas com maior alongamento do eixo caulinar, possibilitando maior visualização dos nós a olho nu, facilitando seu isolamento para utilização como explante. Já os segmentos nodais de origem apical produziram plantas com menor alongamento quando comparados aos demais segmentos nodais.

Tabela 6 – Análise biométrica de plantas produzidas a partir de segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* com três meses de idade originários de diferentes posições no caule alongado cultivados em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluído a um quinto por três meses.

	Número de folhas (un)	Comprimento da parte aérea (cm)	Número de raiz (un)	Comprimento da raiz (cm)	Número de segmentos nodais (un)
Apical	10 b	12,00 a	3 b	16,81 a	3 b
Mediana	13 a	10,97 a	5 a	14,54 b	9 a
Basal	12 a	11,59 a	3 b	16,83 a	8 a

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

A tabela 7 mostra que o acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea de *A. strobilacea* não foi influenciado pela origem do explante. Para raiz, observou-se que o segmento proveniente da região apical da planta matriz produziu raízes com maior massa fresca e seca em relação àqueles retirados das regiões mediana e basal.

Tabela 7 – Análise de massa fresca e seca das partes aérea e radicular de plantas com três meses de idade produzidas a partir de segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* originários de diferentes posições no caule alongado cultivados em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluído a um quinto por três meses.

	Parte aérea		Raiz	
	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Apical	0,296 a	0,015 a	0,106 a	0,007 a
Mediana	0,303 a	0,018 a	0,073 b	0,005 b
Basal	0,290 a	0,014 a	0,059 b	0,004 b

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

Os resultados do estudo da intensidade luminosa na produção de plantas mostraram que a intensidade luminosa de  $14 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi a mais adequada à produção de segmentos nodais. Quando esses segmentos foram isolados e subcultivados, as plantas mais alongadas foram aquelas provenientes das regiões medianas e basais.

#### Cultivo em casa de vegetação

A tabela 8 mostra os resultados referentes aos parâmetros biométricos e massa fresca e seca das partes aérea e radicular das plantas que receberam as soluções nutritivas contendo macronutrientes do meio de Murashige e Skoog (1962) (MS/2, MS/5, MS/10 e MS/100) além daquelas adubadas com a concentração original desse meio. A figura 3 mostra o aspecto geral das plantas após o período de cultivo.

Os maiores valores significativos entre todos os tratamentos para cada parâmetro avaliado foram observados nas plantas regadas com MS completo e com a diluição dos macronutrientes à metade (MS/2). Com a menor concentração dos macronutrientes, as plantas apresentaram menores valores dos parâmetros analisados. Plantas regadas com MS/100 produziram menor quantidade de folhas por planta, sem apresentar diferenças significativas da solução diluída a um décimo (MS/10). Em relação aos teores de massa fresca das partes aérea e radicular, observa-se que quanto mais diluído o meio menor o acúmulo de matéria fresca tanto na parte aérea quanto na raiz.



Figura 3. Plantas de *A. strobilacea* regeneradas a partir do cultivo *in vitro* de segmentos nodais, transferidas para condições *ex vitro* cultivadas por 8 meses adubadas com diferentes diluições dos macronutrientes do meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962): (1) MS diluído à 1/100, (2) MS diluído à 1/10, (3) MS diluído à 1/5, (4) MS diluído à 1/2 e (5) MS completo. (A) plantas nos vasos - (B) após retirada das plantas para avaliação.

Tabela 8 – Quantidade e tamanho de folhas, massas fresca e seca das partes aéreas e radicular de plantas cultivadas *ex vitro* com 8 meses de idade regeneradas via segmentos nodais cultivados *in vitro* por dois meses em meio MS/5 sob temperatura de  $26 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa  $40 \mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ .

Tratamentos	Número de folhas (un)	Parte aérea			Raiz	
		Comprimento das folhas (cm)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
MS completo	51 a	50,75 a	76,04 a	7,97 a	44,46 a	5,95 a
MS/2	41 a	48,12 a	46,66 b	4,99 b	39,15 a	4,48 a
MS/5	28 b	40,75 b	22,14 c	2,38 c	18,98 b	2,56 b
MS/10	19 bc	23,44 c	9,60 d	1,06 cd	10,23 bc	0,84 c
MS/100	10 c	4,89 d	0,54 d	0,06 d	1,41 c	0,17 c

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

Os resultados do experimento de adubação mostraram que a diluição de MS/2 pode ser adequada ao crescimento das plantas. Comparando-se os dados da tabela 8 aos das tabelas 2 e 3 é possível observar que no cultivo *ex vitro* as plantas apresentam melhor crescimento em solução contendo maior concentração de macronutrientes do que na condição *in vitro*. Não foi observado alongamento do eixo caulinar quando cultivada na casa de vegetação, sugerindo que o surgimento deste fenótipo esteja relacionado com as condições do cultivo *in vitro*, as quais as plantas são submetidas.

## DISCUSSÃO

O cultivo *in vitro* a partir de sementes foi estabelecido para diversas espécies de bromélias, como descrito por Mercier & Kebauy (1992), Grossi (2000), Nievola *et al.* (2001), Pickens *et al.* (2003), Rech-Filho (2005), Pickens *et al.* (2006), Bellintani *et al.* (2007), Kanashiro *et al.* (2007), dentre outros. As sementes presentes nas espécies de Bromeliaceae podem apresentar apêndices que podem ser plumosos ou aliformes, ou serem desprovidas de apêndices. Na subfamília Pitcairnioideae ocorrem sementes aladas. Em Tillandsioideae as sementes são plumosas e nas Bromelioideae as sementes não possuem apêndices (Moreira *et al.* 2006), como é o caso de *Acanthostachys strobilacea* estudada neste trabalho. A maioria das espécies cultivadas *in vitro* possui sementes com apêndice plumoso, tais como *Tillandsia*, *Vriesea gigantea*, *Vriesea philippocoburgii*, *Alcantarea imperialis*, *Guzmania*. Para a desinfestação destas é comumente utilizada solução de hipoclorito de sódio adicionada de detergente. Entretanto, o cultivo *in vitro* iniciado a partir de sementes

de Bromeliaceae que apresentam mucilagem como *A. strobilacea* é pouco documentado. Grossi (2000) utilizou ácido clorídrico à 25 % no processo de desinfestação para remover a mucilagem das sementes de *Aechmea nudicaulis*. Neste trabalho o uso desse ácido também foi mais eficiente para desinfestação das sementes de *A. strobilacea*.

O uso de ácido clorídrico também foi documentado para outras espécies cujas sementes são envolvidas por mucilagem, como é o caso do tomateiro (Marigoni *et al.* 1994). Porém, segundo os autores, esse tratamento causou uma redução na emergência das plântulas. Já as sementes de gabioba que também são envoltas por uma mucilagem, o uso de ácido clorídrico para a desinfestação não afetou a qualidade das mesmas (Camona *et al.* 1994), da mesma forma que descrito neste trabalho para *A. strobilacea*.

O desenvolvimento satisfatório das plantas cultivadas *in vitro* a partir das sementes pode depender da composição do meio de cultivo. O meio de cultura mais utilizado para o cultivo de bromélias é a formulação de Murashige e Skoog (1962) (Mercier & Kerbauy 1997), entretanto essa composição pode ter algumas modificações de modo a atender necessidades específicas de cada espécie (Chen *et al.* 2006, Bellitani 2007). Contudo, neste trabalho, ao iniciar-se o estabelecimento do cultivo de *Acanthostachys strobilacea* em diferentes diluições dos macronutrientes do meio MS, foi verificado que em todos os tratamentos existiam plantas com eixo caulinar alongado, diferente do que é observado na natureza. Esse aspecto possibilitou que se utilizassem os segmentos nodais isolados de matrizes para obtenção de novas plantas. Assim, observou-se que o meio MS/5 induziu a um alongamento tal que permitiu a visualização melhor dos nós de modo a facilitar o isolamento destes e posterior transferência para meio novo, potencializando a obtenção de plantas. Gomes & Shepherd (2000), trabalhando com *Sinningia allagophylla*, uma espécie herbácea nativa do cerrado, observaram uma diminuição do eixo principal em solução de MS contendo menores concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) diferentemente dos resultados obtidos com *A. strobilacea* que apresentou um aumento do seu eixo caulinar utilizando-se  $0,027 \text{ mg L}^{-1}$  desse sal (concentração encontrada em MS/5). Assim, à semelhança de outras bromélias epífitas (Mercier & Kerbauy 1992, Tamaki *et al.* 2007), *A. strobilacea* apresentou maior crescimento quando cultivada em soluções diluídas dos sais de Murashige & Skoog (1962).

Apesar de o maior alongamento ocorrer em plantas cultivadas em MS/5, não foi observada diferença significativa no acúmulo de matéria fresca da parte aérea das

plantas em relação aos tratamentos, provavelmente devido à amostra de massa fresca conter além do caule, as folhas das plantas. Contudo plantas cultivadas em MS/10 apresentaram maiores teores de matéria fresca na raiz, provavelmente devido a um acúmulo maior de água em relação às plantas dos demais tratamentos, uma vez que na análise de matéria seca não apresentou diferenças significativas em relação aos demais meios nutritivos empregados neste estudo.

Kerbauy & Mercier (1997) verificando o efeito de diferentes fontes nitrogenadas no crescimento *in vitro* de três espécies de bromélias, constataram um aumento no comprimento da parte aérea da epífita *Tillandsia pohliana*, na presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  na concentração de 16 mM de N, concentração esta semelhante à encontrada em MS/5 (12,01 mM de N). De acordo com Benzing & Renfrow (1974) as bromélias possuem alta afinidade para os minerais em soluções muito diluídas absorvendo-os rapidamente quando se tornam disponíveis no ambiente. Tamaki *et al.* (2007) estudando o efeito de diferentes diluições do meio MS no crescimento de *Ananas comosus*, concluíram que o cultivo pode ser feito em MS/5 e que diminuição dos conteúdos de massa seca e fresca somente ocorreu em diluições dos macronutrientes de MS acima de 60 vezes. Kanashiro *et al.* (2007) estudando *Aechmea blanchetiana*, mostram que concentração de 7,5 mM de nitrogênio do meio MS foi ótima para produção de massa seca e fresca, esta concentração corresponde a aproximadamente ao MS/10 utilizado neste trabalho.

A propagação em massa de *A. strobilacea* por segmentos nodais possibilita a otimização da produção, pois a partir de uma semente é possível obter-se pelo menos mais três plantas, conforme demonstrado neste trabalho. Portanto as plantas cultivadas em MS/5 podem ser uma alternativa ao cultivo por sementes, já que com o caule alongado torna-se muito fácil isolar segmentos nodais e cultivá-los de modo a produzir clones desta planta.

A utilização de segmentos nodais como explantes é comum no cultivo *in vitro* de diversas espécies (Bordón *et al.* 2000, Nhut 1998), porém, em sua maioria, são utilizados reguladores de crescimento no processo de regeneração de plantas a partir dos explantes (Parabia *et al.* 2007, Kiss *et al.* 1995). Contudo, métodos que evitem o uso dessas substâncias são recomendáveis, pois variações somaclonais podem estar associadas à utilização destas (Joyce *et al.* 2003). Este trabalho mostrou que segmentos nodais de *A. strobilacea* possuem taxa de regeneração de 100 % na ausência de reguladores de crescimento semelhante a *Ananas comosus* demonstrado nos trabalhos de Tamaki *et al.* (2007) e Souza *et al.* (2003).

Apesar da maioria das plantas cultivadas em MS/5 apresentarem o alongamento do caule, em cerca de 10 % não ocorria esse alongamento (dados não mostrados). Com intuito de verificar as causas desse alongamento não uniforme, foi investigada a influência da luz no alongamento já que se trata do fator freqüentemente associado a fenômenos como esse, pois segundo Von Arnim & Deng (1996) a intensidade luminosa e a composição do comprimento de onda são fatores importantes na determinação da velocidade do crescimento celular, no acúmulo de pigmentos e na diferenciação de plastídeos.

A micropropagação de plantas por meio do alongamento do eixo caulinar é bastante documentada para abacaxizeiro (Nievola *et al.* 2005; Moreira *et al.* 2003; Kiss *et al.* 1995), utilizando plantas estioladas devido a condições de ausência de luminosidade. Contudo, *A. strobilacea* apresentou maior número de segmentos nodais visíveis no claro ( $14 \mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ) do que no escuro. Na presença de luz, os segmentos nodais produzidos possuíam diâmetro maior em relação às plantas estioladas no escuro, além de apresentar clorofila, indicando capacidade fotossintética pelo explante (dados não mostrados).

Kodym & Zapata-Aria (1999), cultivando meristema apical de *Musa acuminata* sob diferentes intensidades luminosas,  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em sala de cultura e  $570 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em ambiente natural, observaram que maiores taxas de multiplicação foram observadas nas plantas que estavam submetidas a maiores intensidades luminosas. Apesar de altas taxas de regeneração para algumas espécies ocorrer em altas irradiâncias, a tecnologia de cultura de tecidos foi desenvolvida usando baixas intensidades luminosas ( $15 - 65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Lee & Wetzstein (1988) constataram que níveis de luz excedendo a  $315 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  induziu a clorose foliar no cultivo de *Liquidambar sp.*. Exposição a alta irradiância pode levar à fotoinibição e à fotooxidação danificando o aparato fotossintético potencializado por fatores adicionais de estresse como baixos níveis de  $\text{CO}_2$  e altas temperaturas (Powels 1984).

Radmann *et al.* (2001), estudando a influência da densidade do fluxo luminoso na multiplicação de *Gypsophila paniculata*, observaram que mesmo em condições de luminosidade as plantas apresentaram alongamento do eixo caulinar. Esses autores verificaram não existir diferenças significativas em relação ao número de entrenós, entretanto, as plantas submetidas a  $15,705 \text{ W.m}^{-2}$  de densidade de fluxo luminoso apresentaram maior comprimento dos entrenós em relação às plantas dos demais tratamentos que tinham maior intensidade ( $41,88$  e  $83,79 \text{ W.m}^{-2}$ ).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que para o crescimento e desenvolvimento de *A. strobilacea* não houve diferenças em relação às intensidades luminosas estudadas (14, 41 e 50  $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ), podendo ser utilizada qualquer uma delas, entretanto a menor intensidade estudada (14  $\mu\text{M m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ) favoreceu o alongamento do eixo caulinar facilitando a utilização dos segmentos nodais como explante. Contudo, mesmo na intensidade de luz menor, o alongamento não era observado em 100% das plantas cultivadas *in vitro*. Devido a esse resultado, procurou-se investigar se a posição do segmento nodal, retirado das plantas matrizes poderia estar influenciando o desenvolvimento das plantas em função de um gradiente hormonal auxina/citocinina presente no eixo caulinar. É necessário ressaltar que os segmentos nodais isolados eram obtidos de várias plantas, que tinham seus caules seccionados, não havendo distinção do segmento nodal em relação à sua posição no caule. Ou seja, todos os nós eram transferidos indistintamente para os frascos de cultivo.

O eixo caulinar das plantas pode apresentar gradiente basípeto de auxina e acrópeto de citocinina. Raízes são os principais centros produtores de citocinina, porém, outros sítios de produção de citocinina são identificados em algumas espécies. Este fitorregulador é transportado para a parte aérea via xilema e atuam, entre outros, na formação de gemas caulinares, em sinergismo com auxina, que é produzida no ápice caulinar e tecidos jovens e possuem um transporte basípeto (Mercier 2004).

Estudos mostram que balanços hormonais com elevada proporção de citocinina favorecem a diferenciação em gemas caulinares e de ao contrário, elevada proporção relativa de auxina induz a diferenciação de raízes nos tecidos parenquimáticos da medula (Skoog & Miller, 1956). Assim a razão citocinina/auxina que pode estar presente no segmento nodal isolado pode interferir na morfogênese da planta obtida a partir do desenvolvimento da gema lateral.

Este trabalho mostrou que independentemente do local de origem, todos os segmentos nodais regeneraram via organogênese direta, por volta do décimo dia após a deposição no meio nutritivo sem a transição para a fase de calo. No caso do explante já possuir células meristemáticas, ocorre organogênese direta, sendo que melhores resultados são atingidos a partir da utilização de tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética, e explantes com tecidos meristemáticos, que são encontrados em gemas caulinares apicais e axilares. A competência é

entendida como a capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário a formação do órgão (Peres, 2002).

Além disso, foi observado que a origem do explante nodal em relação a sua localização no eixo caulinar da planta matriz interferiu no alongamento das plantas desenvolvidas. Estudos têm demonstrado que a posição do explante no eixo caulinar da planta pode influenciar o desenvolvimento de várias espécies, a maioria arbórea. Garcia-Luis *et al.* (1999) observaram que segmentos nodais da região apical apresentaram maiores índices de regeneração direta dos explantes. Em Bromeliaceae não foram encontrados registros de trabalhos sobre a influência da posição do nó sobre o desenvolvimento da planta, possivelmente devido às características naturais dos segmentos nodais que se localizam muito próximos, havendo necessidade de alongamento para facilitar a manipulação para possível fonte de explantes.

Os resultados do experimento de efeito da posição do nó no crescimento de *A. strobilacea*, mostraram que a utilização do segmento nodal apical originou plantas não alongadas e os nós mediano e basal deram origem a plantas alongadas. Embora não fossem realizadas análises hormonais endógenas, pode-se supor que o gradiente hormonal tenha influenciado, pois o menor número de folhas foi observado nas plantas provenientes de segmentos nodais da região apical, fonte endógena de auxina. Contudo, na maioria dos parâmetros analisados, todas as plantas foram similares. Este resultado favorece o cultivo *in vitro* nos dois aspectos, plantas alongadas não aclimatam facilmente, portanto podem servir como planta matriz para fornecimento de segmentos nodais como explante. Já nas plantas não alongadas o isolamento destes nós é dificultado, entretanto aclimatam com facilidade podendo ser produzidas para atender ao mercado de plantas ornamentais.

A etapa envolvida na produção de plantas por meio do cultivo *in vitro* envolve a sua aclimação. A micropropagação, como já mencionado tem sido utilizada como técnica de multiplicação em massa de diversas espécies de plantas, entretanto, muitas espécies exibem baixa taxa de sobrevivência *ex vitro* constituindo um fator limitante para a produção de algumas espécies (Grattapaglia e Machado 1998). Chen *et al.* (2006), avaliando a produção de plantas de *Bupleurum kaoi* produzidas por meio do cultivo *in vitro* de segmentos nodais, não relatou a utilização de nutrientes na fase de aclimação, somente a taxa de sobrevivência das plantas. A maioria dos estudos relata a utilização de soluções comerciais é como pôde ser observado para a espécie *Uniola paniculata* L. produzidas *in vitro* (Valero-Aracama *et al.* 2007).

Valero-Aracama *et al.* (2007), verificando a influência do fornecimento de sacarose e fluxo de CO<sub>2</sub> no cultivo *in vitro* de plantas de *Uniola paniculata*, utilizaram o meio de Murashige & Skoog em duas concentrações: na primeira fase, o estabelecimento do explante *in vitro* ocorreu no cultivo em MS completo, na fase de enraizamento dos brotos, foi utilizado a mesma formulação, porém diluída pela metade (MS/2) e na transferência destas plantas para condições *ex vitro*, foi aplicada semanalmente solução comercial NPK (20-20-20).

Os experimentos de adubação realizados em plantas de *A. strobilacea* mostraram que a solução MS/2 é adequada para possibilitar o crescimento satisfatório das plantas mantidas *ex vitro*, diferentemente de quando foram cultivadas *in vitro*, onde o meio de cultura selecionado para o cultivo foi aquele que continha os macronutrientes de MS diluídos à quinta parte, pois as plantas cultivadas nesse tratamento apresentaram maior quantidade de segmentos nodais. Pode-se supor que a capacidade de retenção de nutrientes pelo substrato é maior em relação à solução encontrada no interior do frasco de cultivo, sendo necessário ser fornecida uma maior concentração de nutrientes para melhorar a absorção dos mesmos. Não foram encontradas referências onde são abordadas diferenças no crescimento de plantas quando adubadas com os mesmos sais presentes no meio de cultura no qual foram produzidas antes de serem submetidas à aclimação.

Após o período de 8 meses em que as plantas ficaram na condição *ex vitro*, as mesmas foram levadas à Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, local onde foram realizadas as coletas de sementes. A taxa de sobrevivência das mesmas foi de 80 %.

Este trabalho apresentou a possibilidade de multiplicação de *Acanthostachys strobilacea* através do cultivo *in vitro*, utilizando como explante o segmento nodal em alternativa ao uso de sementes. No protocolo estabelecido neste estudo, o uso de reguladores de crescimento é dispensável até mesmo na fase de regeneração do explante via segmento nodal. Verificou-se que o cultivo *in vitro* pode ser realizado em soluções diluídas, mais diluídas que aquela utilizada para adubação na etapa de aclimação. Os segmentos nodais foram isolados a partir de plantas cultivadas em baixa intensidade luminosa, a  $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo que intensidades superiores induzem à produção de plantas não alongadas, submetidas diretamente ao processo de aclimação, uma vez que aquelas alongadas não sobrevivem satisfatoriamente à transferência para condições *ex vitro*. Levando-se em conta a posição do segmento nodal, aqueles de origem mediana e basal originam plantas com maior alongamento.

Por meio deste protocolo é possível obter-se 15.000 plantas a partir de uma semente no período de um ano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Almeida, A.B.W., Santana, G.S., Pinheiro, M.R. & Costa, M.A.P.C.** 2002. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24 (2): 296-300.

**Arrabal, R., Amâncio, F., Carneiro, L.A., Neves L.J. & Mansur, E.** 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation* 11: 1081 – 1089.

**Barboza, S.B.S.C. & Caldas, L.S.** 2001. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52<sup>(1)</sup>. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36 (3): 417-423.

**Bellintani, M.C., Lima, C.C., Brito, A.L., Santana, J.R.F. & Dornelles, A.L.C.** 2007. Estabelecimento *in vitro* de *Orthopytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia – Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 5 (2): 1101-1103.

**Benzing, D.H. & Renfrow, A.** 1974. The mineral nutrition of Bromeliaceae. *Botanical Gazette* 135(4): 281-288.

**Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K.

**Bordón, Y., Guardiola, J.L. & Garcia-Luis, A.** 2000. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* Rootstocks. *Annals of Botany* 86: 159-166.

**Camona, R., Reszend, L.P. & Parente, T.V.,** 1994. Extração química de sementes de Gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb.). *Revista Brasileira de Sementes*. 16 (1): 31-33.

**Carneiro, L.A., Araújo, R.F.G., Brito, G.J.M., Fonseca, M.H.P.B., Costa, A., Crocomo, O.J. & Mansur, E.** 1999. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 79-83.

**Chen, U.C., Hsia, C.N., Yeh, M.S., Agrawal, D.C. & Tsay, H. S.** 2006. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi* – an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 42: 128-133.

**Dittrich, V.A.O., Kozera, C. & Silva, S.M.** 1999. Levantamento florístico dos epífitos vasculares do Parque Barigüi, Curitiba, Paraná, Brasil. *Iheringia* 52: 11-21.

**Endres, L. & Mercier, H.** 2001. Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. *Journal of Plant Nutrition* 24 (1): 29-42.

**Faustino, T.C. & Machado, C.G.** 2006. Frugivoria por aves em uma área de campo rupestre na Chapada Diamantina, BA. *Revista Brasileira de Ornitologia* 14 (2): 137-143.

**Figueiredo, M.L.** 2003. Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de Bromeliaceae nativas do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

**Fonseca, M.H.P.B., Carneiro, L.A., Araújo, R.F.G., Brito, G.J.M., Costa, A., Crocomo, O. J. & Mansur, E.** 1999. *In vitro* regeneration from leaf explant of *Neoregelia cruenta* (R.Graham) L.B. Smith, and endemic bromeliaceae species from eastern Brazil. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* 55: 79-83.

**Garcia-Luis, A., Bordón, Y., Moreira-Dias, J.M. Molina, R.V. and Guardiola, J.L.** 1999. Explant Orientation and Polarity Determine the Morphogenic Response of Epicotyl Segments of Troyer Citrange. *Annals of Botany* 84: 715-723.

**Gomes, M.A.N. & Shepherd, S.L.K.** 2000. Estudo nutricional mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia alagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. Revista Brasileira de Botânica 23 (2): 153-159.

**Gonçalves, C.N. & Waechter** 2003. Aspectos florísticos e ecológicos de epífitos vasculares sobre figueiras isoladas no norte da planície costeira do Rio Grande do Sul. Acta Botânica Brasílica 17 (1): 89-100.

**Grattapaglia, D. & Machado, M. A.** 1998. Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. orgs. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa/ CBAB 1: 183-206.

**Grossi, F.** 2000. Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia. Tese de Doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.

**Haisel, D., Hofman, P., Vagner, P., Lipavská, H., Tichá, I., Schäfer, C. & Capcová, V.** 2001. *Ex vitro* phenotype stability is affected by *in vitro* cultivation. Biologia Plantarum 44 (3): 321-324.

**Joyce, S.M., Cassells, A.C. & Jain, M.** 2003. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 103-121.

**Kanashiro, S., Ribeiro, R.C.S., Gonçalves, A.N., Dias, C.T.S. e Jocy, T.** 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm. cultivada *in vitro*. Hoehnea 34 (1): 59-66.

**Kiss, E., Kiss, J., Gyulai, G. & Heszky, L.E.** 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. HortScience 30: 127-129.

**Kodym, A. & Zapata-Airas, F.** 1999. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* cultura of banana (*Musa acuminata* cv. "Grande Naine"). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55: 141-145.

- Lawn, G.** 2008. Bromeliads in hanging baskets. *Bromeliaceae* 17 (3): 9-10.
- Lee N. & Wetzstein, H.Y.** 1988. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. *Journal American Society Hortorticultural Science* 113 (1): 167-171.
- Lenzi, M., Matos, J.Z. & Orth, A.I.** 2006. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var: *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Botânica Brasília* 20 (2): 487-500.
- Lommer, W.J.M. & Struik, P.C.** 1992. Influence of a single non-destructive harvest on potato plantlets grown for minituber production. *Journal Agricultural Science* 40: 21-41.
- Maringoni, A.C. & Kurozawa, C.** 1994. Erradicação de *Xanthomonas campestris* PV. *Vesicatoria* em sementes de tomateiro. *Revista Brasileira de Sementes* 16 (2): 191-194.
- Mendes, G.C., Soares, C.Q.G., Braga, V.F., Pinto, L.C., Santana, R., Viccini, L.F. & Peixoto, P.H.P.** 2007. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 5 (2): 972-974.
- Mercier, H & Kerbauy, G.B.** 1992. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 30: 247-249.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 40: 43-57.
- Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2003. Obtenção de bromélia *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidália* 1(1): 57-62.

**Moreira, M.A., Pasqual, M., Carvalho, J.G. & Fráguas, C.B.** 2003. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro CV. Pérola. *Ciência Agrotecnica* 27 (5): 1002-1006.

**Moreira, B.A., Wanderley, M.G. & Cruz-Barros, M.A.V.** 2006. Bromélias: importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia. Curso de capacitação de monitores e educadores. Instituto de Botânica – Ibt. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente.

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

**Nhut, D.T.** 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant cell reports* 17: 913-916.

**Nievola, C.C., Mercier, H. & Majerowicz, N.** 2001. Uréia: uma possível fonte de nitrogênio orgânico para as bromélias com tanque. *Bromélia* 6: 1-4.

**Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B.M., Mercier, H.** 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 41: 832-837.

**Parabia, F.M., Gami, B., Kothari, I.L., Mohan, J.S.S. & Parabia, M.H.** 2007. Effects of plant growth regulators on *in vitro* morphogenesis of *Leptadenia reticulata* (Retz.) W. & A. from nodal explants. *Current Science* 92 (9): 1290-1293.

**Pereira, M.J.** 2006. Conservation of *Vaccinium cylindraceum* smith (ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 42: 65-68.

**Pereira, J.E.S., França, R.B., Dantas, A.C.M., Fortes, G.R.L.** 2005. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. *Horticultura Brasileira*. 23 (1): 86-89.

**Peres, L.P.P.** 2002. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 25: 44-48.

**Pickens, K.A., Affolter, J.M. & Wetzstein, H.Y.** 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii in vitro*. *HortScience* 38 (1): 101-104.

**Pierik, R.L.M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

**Preece, J.E. & West, T.P.** 2006. Greenhouse growth and acclimatization of encapsulated *Hibiscus moscheutos* nodal segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87: 127-138.

**Powels S.B.** 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiology* 35: 15-44.

**Puddephat, I.J., Alderson, P.G. & Wrigth, N.A.** 1997. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. *Journal of experimental Botany* 48 (309): 951-962.

**Radmann, E.B., Braga, E.J.B., Karan, M.A.L., Posada, M.A.C. & Peters, J.A.** 2001. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gysophila paniculata* L. *Revista Brasileira de Agrociência* 7 (3): 171-175.

**Rech-Filho, A.R., Dal Vesco, L.L., Nodari, R.O. Lischka, R.W., Muller, C.V. & Guerra, M.P.** 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity e Conservation* 14: 1799 – 1808.

**Reis, E.S., Pinto, J.E.B.P., Corrêa, R.M., Bertolucci, S.K.V. e Lameira, O.A.** 2004. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de Ipeca (*Psychotria ipecacuantha* (Brot.) Stokes *in vitro*. *Ciência agrotécnica de Lavras* 28 (3): 703-709.

**Reitz, R.** 1983. Bromeliaceas e malária-bromélia endêmica. Itajaí. Flora Ilustrada Catarinense. Série 983.

**Rodrigues, T.M., Paiva, P.D.O., Rodrigues, J.G.C., Ferreira, C.A. & Paiva, R.** 2004. Desenvolvimento de mudas de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. Ciência Agrotécnica 28 (4): 757-763.

**Sasaki, R.M. & Felipe, G.M.** 1998. Response do *Dalbergia miscolobium* Benth. seedlings, a cerrado tree species, to mineral nutrient supply. Revista Brasileira de Botânica 21 (1): 65-72.

**Schinor, E.H., Paoli, L.G., Azevedo, F.A., Mourão Filho, F.A.A. & Mendes, B.M.J.** 2006. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* sp. Revista Brasileira de Fruticultura 28 (3): 463-466.

**Silva, A.L.L., Bisognin, D.A., Dornelles, E.B., Walter, J.M. & Franco, E.T.H.** 2004. Ensaios sobre o alongamento de brotos de *Dyckia marítima* Baker dispostos em agrupamentos – Bromeliaceae. Caderno de pesquisa Ser. Bio. 13 (2): 37-46.

**Silva, A.L.L., Dornelles, E.B., Bisognin, D.A., Franco, E.T.H. & Horbach, M.A.** 2007. Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral – an extinction threatened bromeliad. Iheringia 62 (1-2): 39-43.

**Siqueira Filho, J.A. & Machado, I.C S.** 2001. Biologia reprodutiva de *Canistrum auratiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. Acta Botanica Brasilica 15 (3): 427-443.

**Skoog, F. & Miller, C.O.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposio of the Society for Experimental Biology 11: 118-231.

**Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J. Montagu, M.V & Straeten, V.D.D.** 1997. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Plant Natl Acad Sci* 94: 2756-2761.

**Souza, B.M., Kraus, J.E., Endres, L. & Mercier, H.** 2003. Relationships between endogenous hormonal level and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 733-739.

**Tadesse, M., Lommen, W.J.M. & Struiki, P.C.** 2000. Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 59-67.

**Tamaki, V., Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar ‘Smooth Cayenne’ em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34 (1): 69-73.

**Termignoni, R.R.** 2005. *Cultura de tecidos vegetais*. Ed. UFRGS.

**Valero-Aracama, C., Wilson, S.B., Kane, M.E. & Philman, N. L.** 2007. Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy – and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43: 237 – 246.

**Von Arnim, A. & Deng, X.W.** 1996. Light control of seedling development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 215-243.

**Zaffari, G.R., Peres, L.E.P., Teacenco, F.A. & Kerbauy, G.B.** 2002. Indole-3-acetic acid metabolism in normal and dwarf micropropagated banana plants (*Musa* spp. AAA). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14: 211-217.

## **CAPÍTULO 2** - Influência do etileno no alongamento e anatomia de plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch cultivadas *in vitro*

### RESUMO

A técnica de micropropagação pode induzir modificações na morfologia das plantas comparadas àquelas provenientes do ambiente natural. *Acanthostachys strobilacea*, uma bromélia ornamental, quando cultivada *in vitro*, tende a alongar seu eixo caulinar, evidenciando a presença dos segmentos nodais, diferentemente do que é observado na natureza. As razões para esse alongamento provavelmente estão relacionadas à condição estabelecida durante a micropropagação, pois quando sementes dessa espécie são cultivadas em gerbox nas mesmas condições de luz e temperatura, originam plantas que não apresentam o alongamento do caule. A micropropagação requer que os frascos utilizados para o cultivo sejam vedados, de modo a evitar a contaminação por microorganismos. Esse procedimento pode ocasionar um acúmulo de gases no interior dos frascos. Um dos gases produzidos pelas plantas é o etileno, um fitorregulador que afeta o desenvolvimento das mesmas e que, provavelmente, acumula-se no interior dos frascos de cultura, interferindo no crescimento de plantas. Entretanto, a maioria dos trabalhos não relaciona a influência desse hormônio no alongamento de plantas cultivadas *in vitro*. Este trabalho tem por objetivo verificar a influência do etileno na indução do alongamento caulinar em plantas de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro*. Para isto, foram utilizadas 280 plantas obtidas partir da regeneração de segmentos nodais cultivados *in vitro*, distribuídas em Erlenmeyers de 250 ml (10 plantas por frasco), distribuídos em 3 tratamentos: um lote que recebeu aplicação de etileno; um lote que recebeu aplicações de 1-MCP (1-metilciclopropeno), um inibidor de receptores de etileno e um lote que recebeu ar sintético. O alongamento das plantas foi comparado a um lote controle, representado por plantas em frascos aos quais não foi aplicada nenhuma substância. As plantas foram mantidas por 2 meses e as aplicações ocorreram semanalmente. Foram realizadas avaliações dos comprimentos das partes aérea e radicular, números de folhas e raízes, massa fresca e seca das partes aérea e radicular e das modificações histológicas no caule após tratamentos. Os resultados mostraram que a aplicação de etileno induziu plantas com maior alongamento, e conseqüente número de segmentos nodais quando comparadas aos demais tratamentos. O etileno influenciou também a anatomia das plantas cultivadas *in vitro* sendo observado um maior diâmetro das células dos caules das plantas desse tratamento. A análise dos dados permitiu concluir que o etileno pode estar envolvido na indução do alongamento caulinar que ocorre nas plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*.

## ABSTRACT

The micropropagation technique can induce changing in the plant morphology compared to those ones from the natural environment. *Acanthostachys strobilacea*, an ornamental bromeliad, when cultivated *in vitro*, tends to elongate its stem axle, showing the presence of nodal segments, differently from what is observed in the nature. The reasons for this elongation probably are related to the established condition while the cultivated *in vitro*, because when this specie seeds are cultivated in gerbox at the same light and temperature conditions, they originate plants whose doesn't presents the stem elongation. The micropropagation needs that the bottles used for the cultivation be sealed, in a way to avoid the contamination by microorganisms. This procedure can enable a gas accumulated into the bottles. One of the gases produced by the plants is the ethylene, a regulator growth which affects the plants development and that, probably, amass itself into the cultivation bottles, interfering with its growth. However, mostly works don't relate this hormone influence at *in vitro* cultivated plants elongation. This work has as objective to verify the ethylene influence at the stem elongment induction in *in vitro* cultivated *Acanthostachys strobilacea* plants. For that, it were used 280 plants obtained from the *in vitro* cultivated nodal segments regeneration, distributed in 250 ml erlenmeyers (10 plants per bottle), distributed at 3 treatments: a lot which received ethylene application; a lot which received 1-MCP applications (1-metilciclopropeno), an ethylene inhibitor and a lot which internal air was renewed (synthetic air). The plant elongment was compared to a control, represented by plants in bottles to which it wasn't made any application of any substance. The plants were kept for 2 months and the applications happened weekly. The stem internal morphology was evaluated. The results showed that the ethylene application inducted more elongated plants, and related number of nodal segments when compared to the other treatments. The ethylene influenced the *in vitro* cultivated plants' anatomy too what is observed because of the large diameter of the cells from this treatment plant stem. The data analysis allowed concluding that the ethylene can be involved at the stem elongation induction that occurs at the *in vitro* cultivated *A. strobilacea* plants.

## INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* consiste na cultura de células ou órgãos vegetais em frascos contendo meio nutritivo sob ambiente controlado (Hartmann *et al.* 2002). É caracterizado pelo cultivo em condições assépticas de modo a evitar que fungos e outros organismos se desenvolvam no meio nutritivo. Com intuito de proteger esta cultura de infecções e para prevenir a dessecação tanto da planta quanto do meio de cultivo, as plantas são propagadas em frascos vedados, com restrição não intencional de trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco e o meio externo (Mensuali-Sodi *et al.* 1992 e Buddendorf-Joosten & Woltering 1994). Esse procedimento interfere na morfogênese de explantes de diversas espécies.

O crescimento e a diferenciação das células vegetais *in vitro* são afetados por substâncias voláteis que se acumulam no interior dos frascos de cultivo, resultado do metabolismo secundário das plantas (Nour & Thorper 1994). Diversos trabalhos são realizados com intuito de se verificar a interferência dessas substâncias na morfogênese de diferentes espécies (Jackson *et al.* 1991, Nour & Torper 1994 e Suzuki & Kerbauy 2006). Entre as substâncias voláteis produzidas pelos tecidos está o etileno, sendo que as repostas a este gás são bastante variáveis em relação às condições de cultivo (Buddendorf-Joosten & Woltering 1994).

Etileno é um fitorregulador produzido a partir da conversão do aminoácido metionina à S-adenosil metionina, posteriormente convertido a aminociclopropano (ACC) através da ação da enzima ACC sintase, o ACC dá origem ao etileno por ação da enzima ACC oxidase (Coli 2004). O etileno pode ser produzido pela própria planta ou pela semente em germinação, sendo conhecido por afetar o crescimento e o desenvolvimento das mesmas, podendo estar envolvido no alongamento caulinar (Nour & Thorper 1994).

A taxa pela qual as células vegetais crescem depende de diversos fatores, tais como sua posição na planta, tipo de células e uma diversidade de fatores ambientais. Essa taxa é controlada pela pressão de turgor dentro da célula contra a parede celular e pela extensibilidade da parede celular. O etileno influencia a re-orientação dos microtúbulos na direção longitudinal, promovendo uma maior expansão lateral (radial) das células, resultando na formação de caules mais curtos e espessos. Esse fitorregulador pode tanto promover como inibir o crescimento dependendo da planta e do tipo de célula (Raven 1996).

O material constituinte das tampas usadas para fechar os frascos de cultura, bem como o agente geleificante do meio de cultura são fontes de etileno abiótico, podendo interferir na quantidade desse gás acumulada no interior dos frascos de cultivo, como constatado por Mensuali-Sodi *et al.* (1992) no cultivo de lavanda (*Lavandula officinalis* x *Lavandula latifolia*).

O acúmulo de etileno pode alterar o fenótipo das plantas (Nour & Thorper 1994), fato verificado durante o cultivo *in vitro* de *Arabidopsis*, nas quais foi observado o alongamento do caule (Smalle *et al.* 1997). Locke *et al.* (2000), verificaram que a adição de ACC (1- aminociclopropano 1-acido carboxílico) no meio de cultura, o qual é convertido a etileno pela ACC oxidase, levou ao aumento no crescimento da parte aérea e diminuição da raiz em plantas de soja. Pérez-Bermúdez *et al.* (1985), testaram a influência da interação do etileno com outros hormônios em hipocótilos de *Digitalis obscura* cultivados *in vitro*. Além disso, esse hormônio esteve envolvido com o padrão de desenvolvimento em rizoma de *Kohleria eriantha* (Almeida *et al.* 2005).

O efeito da aplicação exógena de etileno nas respostas morfogênicas das plantas pode se estudado através da adição de precursores, como o ACC, de inibidores da biossíntese através da adição de substâncias que são capazes de liberar o etileno, criando uma atmosfera enriquecida com este fitorregulador gasoso ou ainda pela eliminação do etileno utilizando a técnica de ventilação forçada, o que permite uma renovação do ar no interior dos frascos de cultivo (Arigita *et al.* 2002). Outro modo de se estudar a ação do etileno na morfogênese, é através do uso de bloqueadores específicos dos receptores de etileno, como por exemplo, o 1-metilciclopropeno (1-MCP) (Blankenship & Dole 2003).

Um trabalho desenvolvido por Visser & Pierik (2007) mostra que o ritmo de difusão do etileno em situação de alagamento varia conforme a espécie e que a concentração do etileno no ápice radicular em solos alagados é fortemente dependente da resistência do tecido adjacente ao ápice, em tecidos mais porosos o mais provável é que o etileno circule via meristema apical.

Etileno inibe o crescimento foliar de plantas de *Catsetum fimbriatum* cultivadas *in vitro* na presença da luz, em comparação com aquela mantidas no escuro. Os teores endógenos de citocininas se mantêm similares nas plantas tratadas e não tratadas com etileno, sugerindo que o etileno poderia estar envolvido no processo de inibição do crescimento foliar sob condições de luminosidade (Suzuki & Kerbauy 2006).

Estímulo na produção de etileno é comum em resposta de plantas submetidas a estresses e este gás pode ter implicações em eventos como senescência de gemas, inibição de antese e amarelecimento foliar, como observado na orquídea epífita *Psycmorchis pusilla* quando cultivada sob fotoperíodo de dia longo (Vaz *et al.* 2004).

A relação existente entre o etileno e a indução do alongamento celular de plantas cultivadas *in vitro* pode ser verificada no trabalho de Smalle *et al.* (1997), o qual mostra que o etileno tem um efeito promotor no alongamento do eixo caulinar de *Arabidopsis thaliana* quando cultivadas *in vitro* na presença de luz. Cortes histológicos desse caule revelaram que as células do hipocótilo foram duas vezes maiores nas plantas tratadas com precursor do etileno (ACC) que as plantas controle, as quais não receberam essa substância. O efeito do etileno no desenvolvimento de bromélias tem sido relacionado à supressão da dominância apical, aumentando assim, a quantidade de brotos produzidos a partir do desenvolvimento da gema axilar (Buddendorf-Joosten & Woltering 1994). Não foram encontrados trabalhos sobre a relação entre etileno, alongamento caulinar e padrões teciduais em espécies de bromélias.

*Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch, estudada neste trabalho, é uma bromélia epífita ou saxícola, de folhas finas e acanaladas contendo tricomas ao longo da lâmina foliar. Possui o escapo floral verde com inflorescências avermelhadas adquirindo a forma de um cone sendo utilizada como planta ornamental (Reitz 1983). Quando cultivada *in vitro* esta espécie tende a alongar seu eixo caulinar, como demonstrado no capítulo 1, evidenciando a presença dos segmentos nodais a olho nu, diferentemente do que é observado na natureza. As razões para esse alongamento provavelmente estão relacionadas à condição estabelecida durante a micropropagação, pois plantas obtidas a partir da germinação de sementes em gerbox não apresentam esse aspecto (figura 1).

Esta etapa do presente trabalho teve por objetivo verificar as respostas de *A. strobilacea* a diferentes atmosferas gasosas durante seu cultivo *in vitro*, com ênfase na interferência sobre os teores de etileno nos frascos (pela presença ou ausência de renovação do conteúdo gasoso dos frascos com ar sintético livre de etileno, ou pela aplicação de uma concentração relativamente elevada desse hormônio na atmosfera dos frascos), ou ainda pela modulação da sua percepção pelas plantas (pela aplicação de 1-MCP, um potente bloqueador de receptores de etileno).

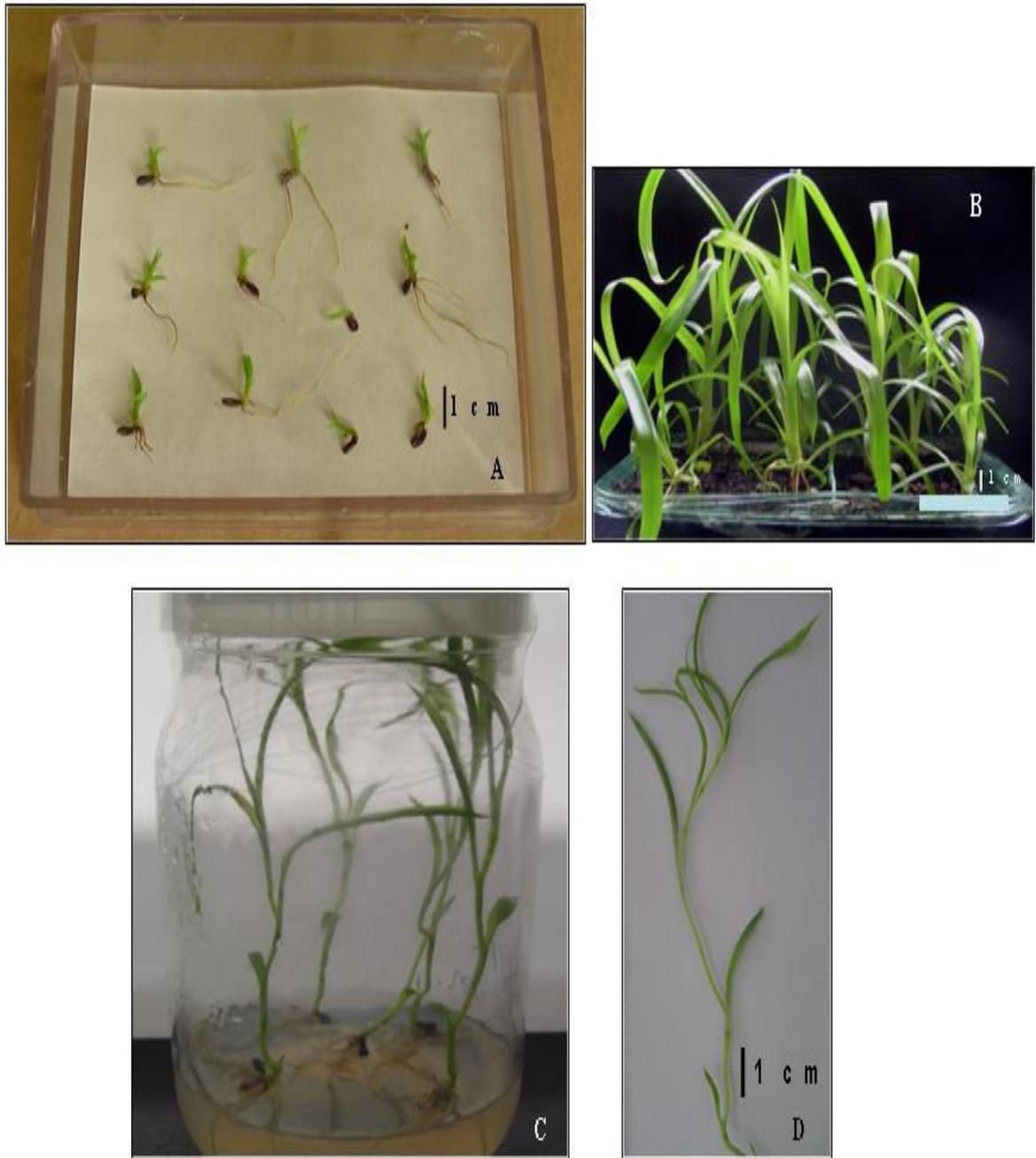


Figura 1. (A) fenótipo de *A. strobilacea* cultivada em caixa do tipo gerbox sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $26 \pm 2$  °C, (B) transferência das plantas para substrato com casca de pinus, (C) fenótipo de *A. strobilacea* cultivada *in vitro* sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $26 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  e (D) detalhe do alongamento do eixo caulinar das plantas cultivadas *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultivo *in vitro*

Plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch foram obtidas por meio da germinação de sementes *in vitro*, as quais foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial (2 % de cloro ativo) acrescido de 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup> mantidas sob agitação por 20 minutos. Passado este período, foram transferidas para uma solução de HCL (ácido clorídrico) a 25 % por 10 minutos. Após enxágue com água destilada, as sementes foram colocadas em etanol 70 % por 5 minutos, e em seguida em fungicida (Benomyl 0,1 %), por mais 15 minutos, sendo posteriormente, submersas por 1 hora sob agitação em solução de hipoclorito de sódio comercial (2 % cloro ativo) com 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup>. Essas sementes foram inoculadas em frascos contendo 40 mL de meio de cultura de Murashige & Skoog (1962), com 1/5 dos macronutrientes da formulação original, 2% de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina. O pH foi ajustado para 5,8. Foram incubadas durante 2 meses em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 2 °C e intensidade luminosa de 14 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. As plantas de *A. strobilacea* desenvolvidas sob essas condições apresentaram um conspícuo alongamento caulinar, permitindo, dessa forma, o isolamento dos seus segmentos nodais, os quais foram utilizados como explantes para a regeneração de plantas a partir da liberação da gema lateral contida em cada um. As plantas assim obtidas foram utilizadas como material experimental onde se buscou analisar a possível influência do etileno sobre o alongamento caulinar dessa espécie quando submetida ao cultivo *in vitro*.

Dessa forma, esses segmentos nodais foram inoculados em erlenmeyers de 250 ml, com 10 explantes cada, contendo o mesmo meio de cultura descrito anteriormente para o cultivo das sementes. Os explantes foram mantidos em incubação em sala de crescimento com 26 ± 2 °C de temperatura e 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa por 75 dias. Durante esse período ocorreu a liberação das gemas laterais dos segmentos nodais, bem como ocorreu o desenvolvimento das mesmas, originando novas plantas com cerca de 1 cm de altura, independentes do explante inicial.

As plantas assim obtidas foram submetidas a partir desse estágio do desenvolvimento a quatro tratamentos distintos, os quais foram compostos por 7 frascos cada um: um lote controle, onde as plantas permaneceram em erlenmeyers totalmente vedados, sem qualquer interferência durante o período experimental; no

segundo lote realizou-se apenas a renovação semanal do conteúdo de ar dos erlenmeyers por meio da aplicação de um fluxo contínuo de  $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  de ar sintético durante 1 minuto em cada frasco; cada frasco pertencente ao terceiro lote recebeu semanalmente a renovação do conteúdo gasoso com ar sintético ( $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 1 minuto), seguida pela aplicação de  $5000\mu\text{M}$  de etileno; por fim, cada frasco do quarto lote de plantas recebeu semanalmente a renovação do conteúdo gasoso com ar sintético ( $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 1 minuto), seguindo-se pela aplicação de  $5\mu\text{M}$  do inibidor de etileno 1-MCP (1-metilciclopropeno) (SmartFresh<sup>®</sup>, preparado segundo recomendações do fabricante).

Após 75 dias avaliaram-se os aspectos morfológicos mais relevantes tanto da parte aérea quanto radicular de cada planta, tomando-se como parâmetros as medidas do número de folhas e raízes, tamanho das partes aérea e radicular, massas fresca e seca das partes aéreas e radiculares, bem como o número de segmentos nodais visíveis à olho nu em cada planta.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância fator único, utilizando-se para comparação entre as médias o teste de Tukey com nível de significância de 5 %.

#### Análise anatômica

Foram separadas aleatoriamente três plantas de *A. strobilacea* de cada tratamento acima descrito, que foram fixadas em FAA 70 (Berlyn & Miksche 1976), por 48 horas e em seguida lavadas em álcool a 70% e conservado em frascos com álcool 50 %.

Para análise anatômica do material, foram retirados fragmentos da região basal do caule dos indivíduos dos diferentes tratamentos. Em seguida, os fragmentos foram hidratados e seccionados manualmente no sentido longitudinal; as secções foram duplo-coradas com safranina a 1% e azul de Astra a 1% (1:9), e montadas em lâminas semi-permanentes com glicerina.

O registro do material foi realizado por meio de fotomicrografias obtidas com uso de microscópio fotônico equipado com câmera para captura de imagens (*software* Image-Pro Express versão 4.0.1, da Midia Cybernetics).

A medida da parte aérea foi realizada após a retirada das folhas considerando-se apenas o eixo caulinar.

## RESULTADOS

A tabela 1 mostra através da análise biométrica, que a atmosfera no interior do frasco interferiu no desenvolvimento das plantas de *A. strobilacea*. O número de folhas foi significativamente maior nas plantas que receberam etileno (nove folhas) quando comparado àquelas dos demais tratamentos. As plantas cultivadas nos frascos que tiveram o ar interno renovado e as dos que receberam aplicações semanais do inibidor de etileno tinham plantas que não apresentaram diferenças significativas no número de folhas. Plantas que cresciam em frascos sem renovação de ar resultaram em número de folhas significativamente maior em relação às plantas que cresciam nos frascos com renovação de ar. Quando se avalia o tamanho da parte aérea das plantas dos diferentes tratamentos, observa-se que as plantas que receberam aplicação de 5000 $\mu$ M de etileno semanalmente tiveram o crescimento do seu eixo caulinar significativamente maior em relação aos demais tratamentos. As plantas que cresceram nos frascos que tiveram aplicação de 1-MCP não apresentaram crescimento significativo do eixo caulinar.

A maior quantidade de segmentos nodais foi observada nas plantas que receberam o etileno, conforme descrito na tabela 1. A aplicação de 1-MCP reduziu 4 vezes o número de segmentos nodais visíveis a olho nu, evidenciando ter havido menor alongamento do caule nesse tratamento. Quando os frascos não tiveram o ar renovado, foi possível observar a existência de 3 segmentos nodais. Esse valor foi estatisticamente diferente do número observado para o tratamento com renovação de ar (tabela 1).

Verifica-se que em relação ao crescimento radicular o efeito da aplicação do etileno foi inibitório. Conforme mostrado na tabela 1, o tamanho das raízes foi significativamente menor nas plantas que receberam etileno, cerca de 4 vezes menores do que aquelas nas quais foi utilizado o inibidor da percepção desse fitorregulador. Comparando-se os tratamentos com e sem renovação de ar, é possível observar que as plantas que tiveram o ar renovado, ou seja, removido o etileno produzido pelas plantas em cultura, tinham raízes menores em relação àquelas cuja atmosfera do frasco manteve-se a mesma desde o início do experimento. Contudo, não foi observado um efeito inibidor da quantidade de raízes nas plantas que receberam o etileno exógeno. Apenas o tratamento com 1-MCP inibiu a quantidade de raízes.

Tabela 1 – Análise biométrica de plantas produzidas a partir de segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluído a um quinto por 75 dias, em frascos sem renovação de ar, com renovação de ar, aplicações de 5  $\mu$ M de 1-MCP e de 5000 $\mu$ M de etileno semanalmente.

	Número de folhas (un)	Número de raiz (un)	Comprimento do eixo caulinar (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Número de segmentos nodais (un)
Sem renovação de ar	8 b	4 a	4,61 b	6,15 c	3 b
Com renovação de ar	6 c	4 a	3,0 c	8,12 b	2 c
1- MCP	6 c	2 b	0,5 d	10,92 a	1 d
Etileno	9 a	3 ab	6,5 a	2,26 d	4 a

Letras distintas na vertical diferem entre si pelo teste Tukey com nível de significância de 0,05.

Avaliando os teores de matéria fresca de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro* a partir de segmentos nodais, os dados da tabela 2 mostram que apenas as plantas que receberam o MCP apresentaram menores valores de massa fresca (valor médio, 0,061 g). As dos demais tratamentos não mostraram diferenças significativas entre si. Entretanto, não houve diferenças quanto à massa seca da parte aérea das plantas de todos os tratamentos. É importante ressaltar que os dados de massa fresca e seca incluíram as folhas e o caule em uma mesma amostra. Diferenças significativas foram verificadas para as raízes. O menor acúmulo tanto de massa fresca quanto de massa seca foi observado nas plantas submetidas à aplicação de etileno em relação aos demais tratamentos, conforme mostrado na tabela 2. Comparando-se esses dados àqueles da tabela 1, nota-se que nesse tratamento as plantas apresentaram raízes menores. Não houve diferenças significativas entre os demais tratamentos em relação à quantidade de massa seca das raízes.

A tabela 1 mostra que com a aplicação de 1-MCP houve o crescimento longitudinal das raízes, assim como também o aumento na massa fresca das plantas (tanto da parte aérea quanto radicular) em relação àquelas crescidas com renovação de ar (condição controle sem acúmulo de etileno).

Tabela 2 – Análise de massas fresca e seca das partes aérea e radicular de plantas produzidas a partir de segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluído a um quinto por 75 dias, em frascos sem renovação de ar, com renovação de ar, aplicações de 5  $\mu$ M de 1-MCP e de 5000 $\mu$ M de etileno semanalmente.

	Parte aérea		Raiz	
	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Sem renovação de ar	0,084 a	0,007 a	0,023 b	0,002 a
Com renovação de ar	0,066 b	0,006 a	0,021 bc	0,002 a
1- MCP	0,061 b	0,006 a	0,032 a	0,003 a
Etileno	0,062 b	0,006 a	0,013 c	0,001 b

Letras distintas na vertical diferem entre si pelo teste Tukey com nível de significância de 0,05.

Os cortes histológicos longitudinal do caule revelaram que, aparentemente, ocorreram diferenças no tamanho e no diâmetro das células da epiderme dos eixos caulinares das plantas submetidas aos diferentes tratamentos (figura 2). Aquelas que receberam a aplicação do inibidor de etileno apresentaram a tendência de possuir células com diâmetro menor em relação àquelas que receberam o etileno (figuras 2B e 2C, respectivamente). Comparando-se as plantas que ficaram nos frascos que não tiveram renovação de ar (figura 2A), ou seja, que puderam conter o etileno produzido por elas durante o período que ficaram em cultivo, às plantas que receberam o etileno exógeno (figura 2C), observa-se certa semelhança quanto ao aspecto das células. As células são mais curtas quando comparadas com as plantas dos frascos sem renovação de ar e com aquela que receberam 1-MCP (figuras 2A e 2C, respectivamente), o diâmetro das células da epiderme das plantas que receberam aplicações de etileno são maiores quando relacionadas com os mesmos tratamentos (figura 2).



Figura 2. Fotomicrografia da secção longitudinal do caule de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*, em frascos com diferentes atmosfera gasosa (A) sem renovação de ar, B) 1-metilclorocilopreno e (C) com etileno. Escala 50  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

O etileno é freqüentemente utilizado no estudo das respostas de crescimento e desenvolvimento de plantas submetidas a diferentes situações de estresse. Contudo, apesar da evidência de que a biossíntese de etileno aumenta em função de diferentes imposições da planta ao estresse, é muito difícil demonstrar a especificidade de seus efeitos (Hall & Smith 1995).

Este trabalho mostrou que a aplicação de etileno promoveu alterações em plantas da bromélia *Acanthostachys strobilacea* cultivada *in vitro*. O tratamento das plantas com etileno, quando comparado às demais condições analisadas, promoveu a visualização de um maior número de segmentos nodais a olho nu, assim como proporcionou o incremento na altura da parte aérea. Em relação à parte aérea houve o etileno promoveu o alongamento, demonstrado pelo número de segmentos nodais visíveis a olho nu que ocorreram nas plantas que receberam esse hormônio. Em relação ao comprimento do caule, as plantas que receberam aplicação de etileno apresentaram maior crescimento, já naquelas que receberam o inibidor de receptores de etileno o eixo caulinar foi significativamente menor em relação aos demais tratamentos, o que corrobora a possível participação do etileno no controle do desenvolvimento caulinar desta espécie. Adicionalmente, houve um desenvolvimento da maior quantidade de folhas nessas plantas em relação aos demais tratamentos.

De maneira interessante, as plantas dos frascos que não tiveram renovação de ar foram as que mais se assemelharam àquelas que receberam o etileno. É possível supor que possa ter havido um efeito do etileno produzido pelas próprias plantas no interior dos frascos e que se acumulou promovendo efeitos semelhantes às plantas tratadas com o fitorregulador. Segundo Mesuali-Sodi *et al.* (2002), o tipo de material constituinte das tampas utilizadas para fechar frascos de cultivo pode liberar etileno como por exemplo, rolha rosqueável de plástico adaptado com rolha de borracha, similares às tampas utilizadas para fechar os frascos nos quais eram mantidas as plantas de *A. strobilacea* analisadas neste estudo.

Da mesma forma, Smalle *et al.* (1997) mostraram um alongamento do epícótilo de plantas de *Arabidopsis* causado pelo etileno na presença de luz. Esses autores mostraram haver inibição do alongamento nas plantas que crescem no escuro, sugerindo que a resposta da parte aérea ao etileno é luz-dependente (Smalle *et al.* 1997). Nour & Torper 1994, constataram que o efeito promotor do etileno no desenvolvimento e alongamento de brotos de *Thuja occidentalis* é contrário aos

registros dos efeitos inibitórios do etileno no crescimento e especialmente alongamento na maioria das espécies.

Suzuki & Kerbauy (2006), observaram que plantas de *Catasetum fimbriatum* cultivadas *in vitro* na presença de luz e tratadas com etileno apresentaram uma redução do tamanho dos brotos estiolados e crescimento foliar, além de retardar o crescimento radicular. Esses autores mencionam que o fenótipo observado no crescimento foliar foi o mesmo observado com outros gêneros de orquídeas quando cultivadas em frascos pouco ventilados, atribuindo este fato ao provável acúmulo de etileno. Apesar de este fitorregulador induzir a uma redução da parte aérea desta espécie quando cultivada no escuro, ele praticamente não exerce nenhum efeito no tamanho e nem na massa seca destas plantas quando cultivadas no claro. O resultado deste estudo mostra claramente que um aumento no nível de etileno leva a uma redução no conteúdo de citocininas nas plantas, gerando uma diminuição do alongamento da parte aérea. A significativa inibição induzida por etileno no alongamento da parte aérea na luz e da raiz no escuro pode ter sido causado pela redução do crescimento longitudinal da célula e pelo aumento dos níveis de citocinina nas partes aéreas e radiculares respectivamente. Análises de hormônios endógenos nas plantas de *A. strobilacea* contribuiriam consideravelmente para explicar a interação do etileno com outros hormônios.

*Hordeum vulgare* quando tratados com substância com ação similar ao 1-MCP, o tiosulfato de prata, observaram uma redução no tamanho da parte aérea de cerca de 40 % em relação ao controle (Locke *et al.* 2000). Contudo, existem trabalhos que citam efeitos opostos aos que foram observados neste estudo. De Proft *et al.* (1985), trabalhando com *Magnólia soulangeana* observaram uma redução no crescimento da parte aérea destas plantas quando tratadas com etileno e CO<sub>2</sub>. Segundo Arigita *et al.* 2002, o papel desse fitorregulador na micropropagação é controverso: em alguns casos ele atua como inibidor de processos organogênicos, e em outros, é relatado como estimulador do desenvolvimento e alongamento de novas gemas e enraizamento de muitas espécies. Tratamento com ethrel (substância que libera etileno) induziu o desenvolvimento de parte aérea em rizoma de *Kohleria eriantha*, enquanto que tratamento com inibidores de etileno inibiu o desenvolvimento das brotações (Almeida, *et al.* 2005).

O efeito do etileno sobre as raízes das plantas de *A. strobilacea* observado neste trabalho foi o oposto ao da parte aérea, ou seja, houve uma inibição no tamanho das raízes que foram cerca de 5 vezes menores que aquelas das plantas tratadas com

o inibidor de etileno. A massa seca e fresca das raízes das plantas do tratamento com etileno exógeno foi menor. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na quantidade das raízes, indicando que pode ter havido modificações histológicas relacionadas ao comprimento das células. Em relação a raiz o tiosulfato de prata (um inibidor de receptores de etileno) parece não ter efeito sobre o crescimento, apesar de que as raízes eram menores em relação ao controle. O ACC aumenta a produção de etileno e diminui a produção de raiz, diminuindo o número de raiz por planta e inibe seu crescimento, em segmentos caulinares de *Rosa hybrida* (Kepezynski *et al.* 2006). De modo oposto, Pérez-Bermudéz *et al.* (1985), constataram que etileno pode agir como promotor endógeno na regeneração de raiz de segmentos hipocótilo de *Digitalis obscura* cultivada *in vitro*.

Os cortes anatômicos realizados neste trabalho mostram alterações na estrutura celular quando em contato com etileno. As células do eixo caulinar de *A. strobilacea* apresentaram a tendência de aumento no diâmetro quando tratadas com etileno, comparando-se aos demais tratamentos, com a aplicação de 1-MCP, foi possível observar células bem mais finas.

As semelhanças que foram observadas entre as plantas dos tratamentos com etileno exógeno e aquelas que permaneceram nos frascos sem renovação de ar, sugerem que o aspecto alongado dessa espécie cultivada *in vitro* possa ser devido à ação do etileno produzido pelas plantas e acumulado no interior dos frascos de cultivo durante o período de crescimento. Embora esse alongamento seja interessante do ponto de vista da possibilidade de isolamento dos segmentos nodais, as plantas alongadas não são aclimatadas com igual facilidade que aquelas não alongadas (dados não mostrados), provavelmente devido ao tamanho reduzido das raízes e ao maior comprimento do caule. Assim sendo, sabendo-se que esse fenótipo está associado à presença desse gás, é possível evitar os efeitos que prejudiquem a fase de retirada das plantas dos frascos para crescerem em casa de vegetação, etapa importante para a produção comercial. Arigita *et al.* 2003 menciona que a ventilação forçada, utilizada para evitar o acúmulo de gases do interior dos frascos, diminui os efeitos inibitórios do etileno no desenvolvimento de alguns tecidos, entretanto, esses autores mencionam que este processo pode levar a desidratação do meio de cultura, aumento da concentração de sais minerais e aumento do risco de contaminação do meio. Segundo o mesmo autor, o uso de bloqueadores dos receptores de etileno, como o 1-MCP, é uma alternativa de se evitar os efeitos do acúmulo de etileno no frasco de cultura sem gerar os efeitos negativos mencionados anteriormente.

Seguindo o mesmo raciocínio, Kepezyński *et al.* (2006), concluíram que 1-MCP pode ser recomendado para regular o processo de enraizamento no cultivo de parte aérea de *R. hybrida*, uma vez que promoveu tanto a emergência quanto o número de raiz.

A taxa pela qual as células vegetais crescem depende de diversos fatores, como sua posição na planta, tipo de células e uma diversidade de fatores ambientais. Essa taxa é controlada pela pressão de turgor dentro da célula contra a parede celular e pela extensibilidade da parede celular, o etileno inibe o crescimento da planta devido a um decréscimo na extensibilidade (Raven 1996), além disso, o etileno influencia a reorientação dos microtubulos na direção longitudinal, que promove uma maior expansão lateral (radial) das células, resultando na formação de caules mais curtos e espessos. Neste trabalho, foi mostrada a influência do etileno sobre a morfologia interna de *A. strobilacea*. Contudo, Smalles *et al.* (1997), demonstrou que o etileno está envolvido com uma quantidade muito maior de respostas morfogênicas, portanto novas investigações são necessárias para uma melhor compreensão dos efeitos do etileno sobre a anatomia de *A. strobilacea*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abeles, F.B., Morgan, P.W. & Saltveit, M.E.** 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic Press Inc., New York.

**Almeida, J.A.S., Kasheris, C. & Pereira, M.F.D.A.** 2005. Ethylene and abscisic acid in the control of development of the rhizome of *Kohleria eriantha* (Benth.) Hanst. (Gesneriaceae). Brazilian Journal of Plant Physiology 17 (4): 391-399.

**Arigita, L., Tamés, R.S. & Gonzáles, A.** 2002. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. Physiology Plantarum 115: 166-173.

**Arigita, L., Tamés, R.S. & Gonzáles, A.** 2003. 1-Methylcyclopropene and ethylene as regulators on *in vitro* organogenesis in Kiwi explants. Plant Growth Regulation 40: 59-64.

**Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.

**Berlyn, G.P. & Miksche, J.P.** 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State College Press, Ames.

**Blankenship, J.M. & Dole, L.M.** 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. Postharvest Biology and Technology 28: 1-25.

**Buddendorf-Josten, J.M.C. & Woltering, E.J.** 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. Plant Growth Regulation 15: 1-16.

**Carneiro, L.A., Cândido, M.S.D., Araújo, R.F.G., Fonseca, M.H.P.B., Crocomo, O.J. & Mansur, E.** 1998. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L. B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 4 (3 – 4): 152 - 158.

**Carneiro, L.A. e Mansur, E.** 2004. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidalia*, 2(1):12-20.

**Corbineau, F., Engelmann, F. & Côme, D.** 1990. Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Plant Science*. 71: 29-34.

**De Proft, M.P., Van Den Broek, G & Van Dijck, R.** 1985. Implications of the container-atmosphere during micropropagation of plants. *Med Fac Landbouww Rijksuniversiteit Gent*. 50 (1): 19-132.

**Grattapaglia, D., Machado, M.** 1998. Micropropagação In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB 533-568.

**Hall, M.A. & Smith, A.R.** 1995. Ethylene and the responses of plant to estress. *Bulgarian Journal Plant Physiology* 21 (2-3): 71-79.

**Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davis Junior, F.T & Geneve, R.L.** 2002. *Plant propagation: Principles and Practices* 7 ed. New York, Englewood Clippis.

**Jackson, M.B., Abbott, A.J., Belcher, A.R., Hall, K.C., Butler, R. & Cameron, J.** 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *Annals of Botany* 67: 229-237.

**Kepezyński, J. Nemoykina, A. & Kepezyński, E.** 2006. Ethylene and *in vitro* rooting of rose shoots. *Plant Growth Regulation* 50: 23-28.

**Locke, J.M., Bryce, J.H., & Morris, P.C.** 2000. Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 51 (352): 1843-1849.

**Mensuali-Sodi, A., Panizza, M. & Tognoni, F.** 1992. Quantification of ethylene losses in different container-seal systems and comparison of biotic and abiotic contributions to ethylene accumulation in cultured tissues. *Physiologia Plantarum* 84: 472-476.

**Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: *Biotechnology in agriculture and forestry – serie high-tech and micropropagation* (Bajaj, Y.P.S. org.). Berlin: Springer-Verlag: 43-57.

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

**Nour, K.A. & Thorper, T.A.** 1994. The effect of the gaseous state on bud induction and shoot multiplication *in vitro* in eastern white cedar. *Physiology Plantarum* 90: 163-172.

**Pérez-Bermúdez, P., Cornejo, M.J. & Segura, J.** 1985. A morphogenetic role for ethylene in hypocotyl cultures of *Digitalis obscura* L. *Plant Cell Reports* 4: 188-190.

**Reitz, R.** 1983. Bromeliaceas e malária-bromélia endêmica. Itajaí. *Flora Ilustrada Catarinense. Série 983*.

**Santos, V.R., Finger, F.L., Barbaosa, J.G. & Barros, R.S.** 2005. Influência do etileno e do 1-MCP na senescência e longevidade das inflorescências de esporinha. *Bragantia* 24: 33-38.

**Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J. Montagu, M.V & Straeten, V.D.D.** 1997. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Plant Natl Acad Sci* 94: 2756-2761.

**Suzuki, R.M. & Kerbauy, G.B.** 2006. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18 (3): 359-365.

**Vaz, A.P.A., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Kerbauy, G.B.** 2004. Plant Physiology and Biochemistry 42 (5): 411-415.

**Visser, E. J. W. & Pierik, R.** 2007. Inhibition of root elongation by ethylene in wetland and non-wetland plant species and the impact of longitudinal ventilation. Plant, Cell and Environment 30: 31-38.

**Thoyajaksha, J. & Rai, V. R.** 2006. *In vitro* multiplication of *Amomum microstephanum* Baker – an endangered species. Phytomorphology, 56 (1 and 2): 23-28.

### **CAPÍTULO 3** - Influência do tipo de vedação dos frascos de cultura no alongamento de plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch cultivadas *in vitro*

#### RESUMO

O cultivo *in vitro* tem sido aplicado como estratégia de multiplicação de espécies de interesse comercial, pois pode possibilitar a obtenção de um grande número de plantas em pouco tempo, com qualidade estética e fitossanitária. De modo a evitar contaminações por microorganismos, as plantas são cultivadas em frascos fechados que restringem parcialmente a troca gasosa entre o interior dos frascos e o ambiente externo. O acúmulo de gases pode influenciar na morfologia das plantas cultivadas *in vitro*, como é o caso da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea*, que quando cultivada *in vitro* em frascos fechados com tampa plástica e vedados com policloreto de vinila (PVC), apresentaram alongamento do eixo caulinar. Embora os segmentos nodais isolados do caule alongado sejam utilizados para obterem-se novas plantas quando subcultivados, as plantas alongadas apresentam taxa de sobrevivência reduzida quando transferidas para condições *ex vitro*. Levando-se em conta que a concentração dos gases no interior do frasco pode estar relacionada ao tipo de tampa utilizada para vedação destes que permite maior ou menor troca gasosa, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência de diferentes tipos de vedação dos frascos no alongamento de plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*, e identificar se o oxigênio e o gás carbônico estão envolvidos no alongamento do caule. Segmentos nodais de *A. strobilacea* foram depositados em frascos contendo meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluídos em 5 vezes, micronutrientes na composição original, 2% de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, pH 5,8 (geleificado com 6 g L<sup>-1</sup> de Agar). Os frascos foram fechados com três tipos de tampas: tampa plástica vedada com filme de PVC; somente tampa plástica e os demais com rolha de borracha perfurada e preenchida com algodão hidrófilo umedecido com sulfato de cobre. Todos os frascos foram mantidos à temperatura de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 41 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por três meses. As medidas da concentração dos gases acumulados no interior dos frascos foram realizadas quinzenalmente por meio do uso do medidor desses gases (Illinois ILL6600). Observou-se que o maior número de plantas não alongadas ocorreu nos frascos fechados com rolha ou tampa plástica, sem uso de PVC. A análise da concentração de oxigênio e dióxido de carbono no interior dos frascos

fechados com tampa plástica e vedados com PVC, dentro dos quais foram observadas as plantas mais alongadas, mostrou que o acúmulo desses gases ocorreu somente aos 90 dias de cultivo, ou seja, 45 dias após o surgimento de plantas alongadas, não estabelecendo, portanto, relação entre o alongamento e a concentração desses gases. Conclui-se, portanto, que a utilização de rolhas de borracha perfuradas e tampas plásticas não vedadas com PVC são mais adequadas à obtenção de plantas não alongadas, mostrando que as trocas gasosas podem influenciar esse fenótipo. No entanto, o oxigênio e o dióxido de carbono acumulados parecem não influenciar no alongamento das plantas de *A. strobilacea* cultivadas *in vitro*.

#### ABSTRACT

The *in vitro* cultivation has been applied in commercial interesting species multiplying strategy because it can make possible the obtaining of a large number of plants in little time, with esthetics and phitosanitary quality. In a way to avoid contamination by microorganisms, the plants are cultivated in closed flasks whose partly restricts the gas change between the flasks inner and the outer environment. The gas accumulated can influences in the *in vitro* cultivated plant morphology, that is the *Acanthostachys strobilacea* ornamental bromeliad case which when is *in vitro* cultivated in closed with plastic lid and sealed with PVC bottles, presented stem elongation. Although the nodals segments isolated from the elongated stem be used for new plants obtaining when sub cultivated, the elongated plants presents survival rate reduced when transfered to *ex vitro* conditions. Knowing that gas ccumulated in the bottle can be related to the type of lid used for its seal which allows high or smaller gas changing, the objective of this work was to verify the influence of different types of the flasks sealing in the *in vitro* cultivated *A. strobilacea* plants elongation, and identify if the oxygen and the carbon dioxide are involved in the stem elongation. *A. strobilacea* nodal segments were put into flasks containing Murashige & Skoog solution with macronutrients dilutes at a fifth, micronutrients at the original composition, 2% of saccharose, 100 mg L<sup>-1</sup> of myo-inositol and 0,1 mg L<sup>-1</sup> of thiamine, pH 5,8 (gelled with 6 g L<sup>-1</sup> of Agar). The flasks were closed with three types of lids: plastic lid sealed with PVC film; only plastic lid and the others with perforated rubber bottle-stopper and filled with hydrophilic cotton dampen with copper sulphate. All were kept at 26 ± 2 °C temperature, photoperiod of 12 hours and light intensity of 41 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for three months. The measure concentration gas in

the flasks were made by using these gas measurer (Illinois ILL6600). It was observed that not elongated plants occurred at the flasks closed with bottle-stopper or plastic lid, without using PVC. The oxygen and carbon dioxide concentration analysis into the flasks closed with plastic lids and sealed with PVC, whose inside were observed the most elongated plants, showed that these gas accumulated occurred only at the 90 cultivation days, ie 45 days after the elongated plants emergence, doesn't establishing, therefore, relation between the elongation and these gas amassing. It is concluded, therefore, that the use of perforated rubber bottle-stoppers and not sealed with PVC plastic lids are more suitable to the not elongated plant obtaining, showing that the gas changing can influences this phenotype. However, the oxygen and the carbon dioxide amassed seem to don't influence at the *in vitro* cultivated *A. strobilacea* plants elongation.

## INTRODUÇÃO

Muitos aspectos da biotecnologia têm levado a um aumento no interesse na pesquisa do cultivo *in vitro* de plantas. Micropropagação é uma área em expansão na produção em escala comercial, pois permite rápida produção de materiais vegetais geneticamente idênticos e facilita a produção de plantas livres de doença (Buddendorf-Joosten & Woltering 1994).

A micropropagação também tem sido utilizada no cultivo de bromélias, contribuindo para a multiplicação de plantas com qualidade fitossanitária (Arrabal 2002, Mercier & Nievola 2003, Rodrigues *et al.* 2004 e Rech-Filho 2005), de modo a atender a demanda do mercado por espécies ornamentais (Kanashiro 2005), muitas vezes, alvos do extrativismo ilegal. Devido à possibilidade de manutenção das culturas em condições controladas (luz, temperatura, fornecimento de nutrientes, etc.), essa técnica tem sido utilizada para estudos de fisiologia básica (Jensen *et al.* 1996, Kurepin *et al.* 2007, Predieri & Rapparini 2007 e Tamaki *et al.* 2007).

Com intuito de proteger a cultura asséptica de infecções e para prevenir a dessecação tanto das plantas quanto do meio nutritivo, no cultivo *in vitro*, as plantas são micropropagadas em frascos vedados, com restrição não intencional de trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco e o meio externo o que gera um acúmulo de gases no interior dos frascos. Os mais importantes fatores que afetam o acúmulo desses gases são: o tipo e a quantidade de material vegetal, o material utilizado para a fabricação da tampa usada para o fechamento dos frascos, os componentes nutricionais do meio e fatores externos como temperatura, ventilação e intensidade luminosa. Dentre esses, o tipo de tampa utilizada pode permitir uma maior ou menor troca gasosa, possibilitando um acúmulo de gases (Buddendorf-Joosten & Woltering 1994).

O fechamento dos frascos pode ser realizado através de rolhas de algodão, rolhas de celulose porosa semelhantes à cortiça, tampa de alumínio ou papel alumínio e tampas plásticas e, além disso, para evitar evaporação excessiva do meio nutritivo, há necessidade de se utilizar um segundo método de selamento sendo que um dos materiais disponíveis para isso é o filme plástico de PVC (policloreto de vinila), em princípio, esta película deve permitir pequena troca de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e etileno, mas não do vapor d'água (Pierik 1987).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o microambiente formado no interior dos frascos é o responsável pela variabilidade no aspecto das plantas

cultivadas, influenciando na micropropagação. Isso pode ser devido à presença de substâncias voláteis como o etileno, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, sendo que as repostas a estes diferentes gases são bastante variáveis em relação ao tecido cultivado (Nour & Thorper (1994). Esses gases interferem no desenvolvimento de brotos e geralmente produtores comerciais não se preocupam em alterar os níveis dos mesmos durante o cultivo. Entretanto, todas as tampas usadas para fechar os frascos são permeáveis aos gases em alguma intensidade (Hartmann *et al.* 2002). Se o tubo for fortemente fechado, a evaporação é bastante reduzida, mas a umidade no tubo se torna muito alta, induzindo a vitrificação das plantas cultivadas, além disso, o tipo de tampa pode influenciar também na disponibilidade de luz, pois tampas transparentes permitem a passagem de maior intensidade luminosa (Pierik 1987). Portanto, o estabelecimento do cultivo de uma espécie vegetal *in vitro* deve levar em conta o tipo de tampa utilizada para fechar os frascos.

A difusão que ocorre entre o ar interno e o ar externo ou ainda a filtração do ar nas trocas gasosas dos diferentes métodos de fechamento dos frascos, podem promover um aumento da concentração interna do CO<sub>2</sub> tornando-se disponível para a fotossíntese resultando em crescimento das plantas cultivadas mesmo em cultura heterotrófica (Hartmann *et al.* 2002). Existem poucos relatos sobre a influência da concentração do oxigênio no crescimento das plantas *in vitro*. Espera-se que uma diminuição moderada da concentração desse gás não tenha efeito no crescimento e desenvolvimento vegetal. Contudo, a redução da quantidade de O<sub>2</sub> pode apresentar a vantagem de inibir o desenvolvimento de fungos e bactérias no meio de cultura (Buddendorf-Joosten & Woltering 1994).

Para algumas espécies de plantas de interesse econômico, o tipo de tampa utilizado para fechar os frascos foi considerado durante o estabelecimento das culturas, como é o caso de *Bupleurum kaoi*, uma espécie medicinal procedente da China, estudada por Chen *et al.* (2006), por meio do cultivo de segmentos nodais. Os autores utilizaram diferentes tipos de vedação: uma delas foi feita com duas camadas de folha de alumínio e para outra eles utilizara três camadas de papel poroso para fechar erlenmeyers. As plantas cultivadas nos frascos fechados com material mais poroso apresentaram maior taxa de sobrevivência das mesmas quando transferidas para condições *ex vitro*. Embora o tipo de tampa varie muito entre os cultivos *in vitro* a partir de segmentos nodais, como por exemplo, o uso de algodão hidrofóbo (Sharma *et al.* 2006), policarbonato envolto por filme plástico (Tadesse *et al.* 2000) e também tampa plástica selada com parafilme (Carretero *et al.* 2007), os autores não

testaram diferentes tipos de tampa com intuito de verificar a influência destas sobre o desenvolvimento das plantas obtidas.

Em Bromeliaceae foram observadas diferenças no crescimento e desenvolvimento de algumas espécies em função do tipo de tampa usada para fechar os frascos, Pierik (1987), observou o crescimento de *Vriesea splendens* em tubo de ensaios vedados com rolha de algodão, sendo que parte dos tubos estava fechada com tampas de extremidade carbonizada e outros tinham tampas não carbonizadas. Esses autores observaram que as maiores plantas foram retiradas dos frascos cujas rolhas não estavam queimadas. Bellintani *et al.* (2007), cultivou segmentos caulinares de *Ortophytum mucugense* em tubos de ensaio vedados com dois tipos de tampas: PVC e algodão. Observaram que as maiores taxas de sobrevivência em condições *ex vitro* ocorreram nas plantas provenientes dos tubos vedados com algodão. Todavia, não foi encontrado relato sobre a utilização de diferentes tampas na micropropagação de bromélias com objetivo de comparar o desenvolvimento *in vitro* dessas plantas.

Em relação ao conteúdo gasoso existente no interior dos frascos de cultivo, Nour & Torper (1994) estudaram a influência dos gases na indução de brotação, desenvolvimento de embriões e gema axilar no cultivo *in vitro* da parte aérea de cedro branco (*Thuja occidentalis*), foi observado que tanto os acúmulos de etileno e dióxido de carbono, quanto baixas concentrações de oxigênio promoveram o desenvolvimento de gemas axilares desta espécie. Jackson *et al.* (1991) compararam a produção de gases entre plantas micropropagadas de *Gerbera jamesonii*, *Ficus lyrata* e *Solanum tuberosum*. Concluiu que houve variação nas trocas gasosas de acordo com a espécie e constatou que a concentração dos gases presentes no interior dos frascos de cultivo pode definir limites na concentração de: etileno, dióxido de carbono e oxigênio. Para Bromeliaceae não foram encontrados relatos a respeito da influência do acúmulo de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> quando cultivadas *in vitro*. Todavia, a influência do etileno foi verificada para a bromélia *A. strobilacea*, conforme apresentado no capítulo 2 deste trabalho, que mostrou o efeito promotor desse gás no alongamento das plantas cultivadas *in vitro*.

O capítulo 1 deste trabalho mostra que plantas de *A. strobilacea* apresentam alongamento do caule quando cultivadas *in vitro*. Esse aspecto foi associado exclusivamente ao cultivo *in vitro*, pois plantas dessa mesma espécie, cultivadas em câmaras de germinação nas mesmas condições de luz e temperatura, não alongaram. Esse resultado foi atribuído ao acúmulo de etileno, como apresentado no capítulo 2. Portanto, tendo em vista que a condição *in vitro* é responsável pelo alongamento do

eixo caulinar de *A. strobilacea*, este trabalho visou verificar a influência do tipo de vedação dos frascos de cultivo sobre o alongamento dessa espécie. Objetivou-se também identificar a possível influência de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> acumulados no interior dos frascos de cultivo sobre o alongamento, uma vez que foi comprovado que o etileno está envolvido nesse processo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e condições de cultivo

As sementes de *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch utilizadas foram provenientes de plantas existentes na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, São Paulo. O cultivo *in vitro* foi estabelecido no laboratório da Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, conforme descrito no capítulo 1 deste trabalho. As sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial (2 % de cloro ativo) acrescido de 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup> mantidas sob agitação por 20 minutos. Passado este período, foram transferidas para uma solução de HCL (ácido clorídrico) a 25 % por 10 minutos. Após enxágue com água destilada, as sementes foram colocadas em etanol 70 % por 5 minutos, e em seguida em fungicida (Benomyl 0,1 %), por mais 15 minutos, sendo posteriormente, submersas por 1 hora sob agitação em solução de hipoclorito de sódio comercial (2 % cloro ativo) com 2 gotas de Tween 20<sup>®</sup>. Após a desinfestação, em capela de fluxo de ar laminado, as sementes foram depositadas em frascos contendo 40 ml de meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962) (MS) cuja concentração dos macronutrientes foi reduzida a 1/5 da formulação original, adicionado de micronutrientes da composição original do MS, 2% de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina. O pH foi ajustado para 5,8. O meio nutritivo foi geleificado com 6 g L<sup>-1</sup> de agar, sendo esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C. A cultura foi mantida à temperatura de 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram<sup>®</sup>, super luz do dia 40 W). Segmentos nodais foram obtidos de plantas com dois meses de idade, estabelecidas *in vitro*. Após 2 meses de idade, segmentos nodais dessas plantas foram isolados e transferidos para frascos contendo o meio de cultura, fechados com 3 diferentes tipos de tampas conforme descrito a seguir.

### Teste da influência do tipo de vedação dos frascos

Para testar a influência do tipo de vedação utilizada nos frascos de cultivo, foram depositadas 75 segmentos nodais, em frascos com volume de 250 ml (5 frascos para cada tratamento com 5 explantes cada), contendo 40 ml de meio de cultura descritos anteriormente. Foram testados três tratamentos: frascos com tampa plástica vedados com filme de PVC (TPVC) (policloreto de vinila); frascos fechados somente com tampa plástica (TP) e frascos fechados com rolha de borracha perfurada e preenchida com algodão hidrófilo umedecido com sulfato de cobre (TRB), de modo a eliminar os microorganismos para evitar a entrada dos mesmos no interior dos frascos e contaminar a cultura (figura 1). Esse experimento foi realizado sob fotoperíodo de 12 horas. Decorridos 3 meses, avaliou-se os seguintes parâmetros: número de folhas e raízes, tamanho do caule e da raiz, massa seca e fresca das partes aérea e radicular e número de segmentos nodais observados devido ao aumento dos internós. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e as médias foram submetidas à análise de variância fator único, para comparação entre as médias, foi aplicado teste de Tukey com nível de significância de 5 %.

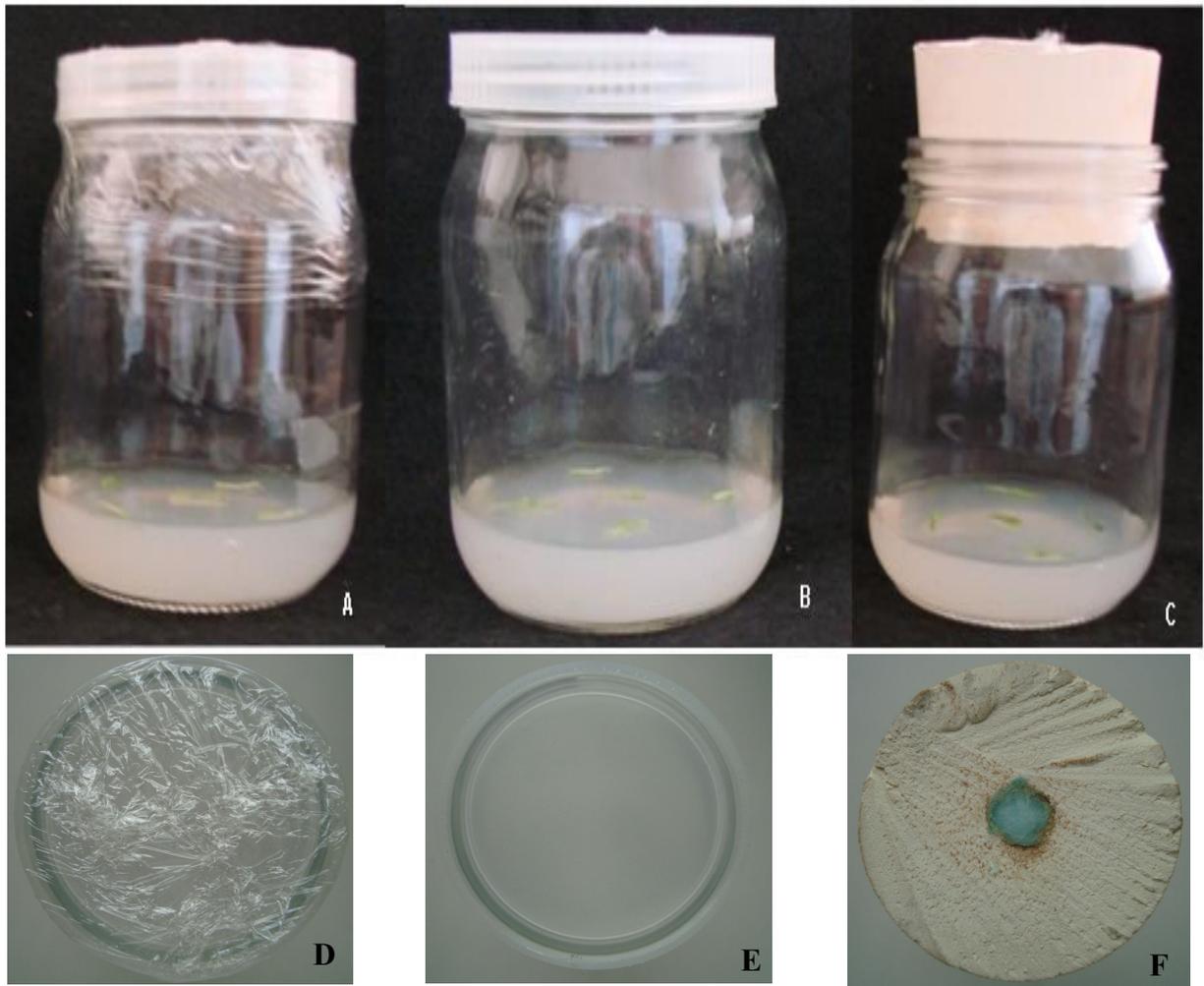


Figura 1. Tampas utilizadas na vedação dos frascos do cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *A. strobilacea* (A) tampa plástica com filme de PVC (TPVC), (B) tampa plástica sem filme de PVC (TP) e (C) rolha de borracha e preenchida com algodão hidrófilo umedecido com sulfato de cobre (TRB). Vista superior das tampas (D) TPVC, (E) TP e (F) TRB.

## Estimativa de gases

A porcentagem de concentração de oxigênio (O<sub>2</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no interior dos frascos foi determinada por analisador desses gases (Illinois ILL6600); este equipamento possui um sensor de oxigênio e um sensor de dióxido de carbono.

Segmentos nodais de *A. strobilacea* foram depositados em frascos do tipo erlenmeyers de 150 ml de volume, vedados com tampa de borracha e filme de PVC, contendo 20 ml de meio de cultura e acondicionados sob as mesmas condições de luminosidade e temperatura como descritos anteriormente, sendo três segmentos nodais por frasco. As tampas de borracha permitiram inserir o eletrodo do equipamento e tomar as medidas dos gases sem precisar abrir a tampa. Após as medidas foram realizadas a quantificação dos números de folhas, raízes e segmentos nodais visíveis, mediu-se o tamanho das partes aéreas e radiculares, as medições ocorreram nos seguintes intervalos de tempo: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias.

A primeira medida foi feita assim que os explantes foram transferidos para o meio de cultura e os frascos foram fechados (tempo zero). Foi considerada como concentração controle de gases aquela presente na atmosfera externa ao frasco, ou seja, 21 % de oxigênio e 0,03 % de dióxido de carbono que foram comparadas às aquelas concentrações existentes no interior dos frascos de cultivo fechados, medidas nos diferentes tempos citados anteriormente.

Para medir o tamanho do eixo caulinar as folhas foram removidas e desconsideradas.

## RESULTADOS

A tabela 1 mostra que as plantas provenientes do tratamento TRB (tampa rolha de borracha) e TP (tampa plástica) não apresentaram eixo caulinar alongado, este aspecto foi observado apenas para aquelas de TPVC (tampa plástica com PVC) (3 segmentos nodais). Entretanto, com exceção do tamanho da parte aérea, nesse tratamento foram observados valores menores para todos os outros parâmetros avaliados. A quantidade de folhas foi significativamente maior nas plantas que estavam nos frascos TRB, em relação às plantas que cresciam nos frascos TP e TRB. A quantidade de raiz foi maior nas plantas do frasco fechados com tampa plásticas, e também maiores em relação ao tamanho quando comparadas com as plantas dos demais tratamentos em relação às plantas dos frascos TPVC e TRB. As plantas que cresciam nos frascos TPVC apresentaram raízes menores quando comparadas com as plantas dos demais tratamentos.

Tabela 1 – Análise biométrica de plantas produzidas a partir de segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluído a um quinto por três meses, em frascos com diferentes tipos de vedação: TPVC - tampa plástica vedada com filme de PVC, TP - tampa plástica e TRB - rolha de borracha perfurada e preenchida com algodão hidrófilo umedecido com sulfato de cobre.

	Número de segmentos nodais (un)	Número do eixo caulinar (cm)	Número de folhas (un)	Número de raiz (un)	Comprimento da raiz (cm)
TPVC	3 a	6,33 a	6 b	3 b	6,61 c
TP	--	0,5 b	6 b	4 a	14,72 a
TRB	--	0,5 b	7 a	3 b	9,88 b

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

A tabela 2 mostra os teores de massa fresca e seca das partes aérea e radiular das plantas originadas de segmentos nodais em frascos com diferentes tipos de tampa. A massa fresca da parte aérea foi significativamente maior nas plantas que cresciam nos frascos com TRB em relação às plantas que cresciam nos frascos fechados com TP e TPVC, nestes dois últimos tratamentos não foram observadas diferenças significativas entre eles.

Analisando a tabela 2 observa-se que a quantidade de massa fresca e seca da parte aérea foi menor quando comparada aos demais tratamentos, contudo acúmulo de massa fresca foi igual às plantas dos frascos TP. As plantas do frasco TP apresentaram massa fresca e seca da raiz significativamente maiores quando comparadas com as raízes das plantas que cresciam nos frascos dos demais tipos de planta.

Tabela 2 – Massa fresca e seca das partes aérea e radicular de plantas produzidas a partir de segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluídos a um quinto por três meses, em frascos com diferentes tipos de vedação.

	Parte aérea		Raiz	
	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
TPVC	0,187 b	0,007 c	0,166 b	0,004 b
TP	0,217 b	0,016 a	0,240 a	0,012 a
TRB	0,317 a	0,012 b	0,126 b	0,005 b

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 5 com 5 replicatas).

A tabela 3 mostra a porcentagem de concentração de oxigênio e dióxido de carbono durante o cultivo *in vitro* em frascos fechados com rolhas e vedados com filme de PVC de segmentos nodais de *A. strobilacea* durante um período de 105 dias. Tomando como referência a quantidade de oxigênio da atmosfera que é de 21 %, observou-se que o acúmulo de oxigênio ocorreu apenas entre 45 e 60 dias de cultivo (21,6%). Até 30 dias de cultivo observou-se menor concentração de oxigênio e maior concentração de dióxido de carbono. Observa-se na tabela 4 que foi nesse mesmo período que os segmentos nodais surgiram (3 segmentos).

Tabela 3 – Percentagem de oxigênio e dióxido de carbono no interior dos frascos de cultivo de segmentos nodais *A. strobilacea* cultivadas por 105 dias sob fotoperíodo de 12 horas, temperatura de  $26 \pm 2$  °C e irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Tempo em dias	O <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)
0	20,4 de	0,04 c
15	20 e	0,44 a
30	20 e	0,14 b
45	20,6 de	0 d
60	21,6 c	0 d
75	21 cd	0 d
90	23 b	0 d
105	24 a	0,1 b

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 3 com 5 replicatas).

Em relação ao CO<sub>2</sub>, a medida controle é de 0,03 %, concentração encontrada no ambiente externo ao frasco. Observou-se que a diminuição na concentração desse gás ocorreu entre 30 e 45 dias de cultivo, atingindo valor igual a zero. A maior concentração desse gás foi identificada aos 15 dias de cultivo. No tempo inicial, observa-se um pequeno aumento na concentração deste gás.

Tabela 4 – Análise biométrica de plantas produzidas a partir de segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* cultivadas *in vitro* em meio de Murashige & Skoog (1962) com macronutrientes diluído a um quinto por 105 dias.

Tempo em dias	Número de folhas (un)	Número de raiz (un)	Comprimento do eixo caulinar (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Número de segmentos nodais (un)
0	--	--	--	--	--
15	5 f	1 d	0,3 d	0,5 e	--
30	12 ef	7 cd	0,5 d	10,8 d	--
45	21 d	10 cd	2,0 c	13,4 d	1 d
60	34 c	17 bc	4 c	20,9 c	3 c
75	38 c	11 cd	7,5 b	28,6 bc	7 bc
90	77 b	24 b	10,5 b	35,6 b	9 b
105	123 a	37 a	13 a	47,9 a	12 a

Médias acompanhadas por letras distintas na vertical diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade (n = 3 com 5 replicatas).

A tabela 4 mostra os parâmetros biométricos referentes às plantas cultivadas durante o período de quantificação do oxigênio e dióxido de carbono. Os resultados mostram que as plantas cultivadas apresentaram um alongamento do eixo caulinar, evidenciando os segmentos nodais. Os demais parâmetros avaliados mostram o desenvolvimento da planta ao longo do tempo, como o crescimento da parte aérea, como aumento do número de folhas e quantidade de raiz.

## DISCUSSÃO

A utilização de tampas plásticas é bastante comum em laboratórios comerciais de cultivo *in vitro*. Tem sido considerado que o tipo de tampa pode determinar os níveis de trocas gasosas com o ambiente externo (Grattapaglia & Machado 1998). Usualmente, para evitar contaminação, os frascos podem ser vedados com filme de PVC que envolve as tampas de plástico ou rolhas de borracha. Porém, esse procedimento pode restringir as trocas gasosas entre o interior do frasco e a atmosfera externa a ele (Grattapaglia & Machado 1998).

Este trabalho mostrou que as plantas cultivadas nos frascos fechados com tampa de plástico envolvida com PVC apresentaram um alongamento do caule conspícuo. Em contraposição, as raízes dessas plantas eram menores que as das plantas dos outros tratamentos os quais eram constituídos por plantas mantidas em frascos com tampas que permitiam maior troca gasosa (tampa de borracha perfurada e tampa de plástico sem filme de PVC). É provável que esses efeitos sejam devido ao maior acúmulo de gases existentes no interior dos frascos vedados com PVC, pois a difusão destes para a atmosfera externa foi dificultada pelo tipo de tampa. No

capítulo 2, que mostrou o efeito do gás etileno no alongamento de plantas cultivadas *in vitro*, também foi utilizado PVC para fechar os frascos. Resultados semelhantes foram observados no cultivo *in vitro* de macieira, Citrus e eucalipto quando cultivados em frascos tampados com filme de PVC (Grattapaglia & Machado, 1998).

Nour & Torper (1994), trabalhando com *Thuja officinalis*, observaram que a indução e alongamento de parte aérea desta planta foram significativamente afetados pelo tipo de frasco utilizado, os brotos produzidos em frascos com tampa de soro hermeticamente vedados apresentaram alongamento aproximadamente três vezes mais que os dois outros tipos de frascos (rolha de espuma, placa de Petri selada com filme), o tamanho da parte aérea apresentou diferença significativa somente após 60 dias de cultivo, até o 25º dia não se observaram diferenças nas plantas dos diferentes tratamentos, com plantas de *A. strobilacea*, neste estudo, o maior comprimento da parte aérea foi observado nas plantas que cresciam nos frascos TP, onde possivelmente ocorriam maiores trocas gasosas com o meio externo quando comparado com os frascos vedados com filme de PVC. Jackson *et al.* (1991), constataram que uma baixa aeração do frasco de cultura pode ser prejudicial ao crescimento das plantas, entretanto há respostas diferenciadas em função da espécie cultivada.

Alguns trabalhos relacionam o efeito conjunto do etileno e o CO<sub>2</sub> sobre o alongamento celular como relatado para plantas de *Thuja officinalis*, nas quais altos níveis tanto de etileno quanto de CO<sub>2</sub> favoreceram o desenvolvimento e o alongamento de brotos. Nesse trabalho foi demonstrado que a remoção de um ou outro ou de ambos os gases, acarretou na redução tanto no número quanto no tamanho dos brotos produzidos. Neste trabalho, os autores concluíram que a emissão de compostos voláteis pelos explantes cultivados pode modificar o padrão de morfogênese *in vitro*. Entretanto, a quantificação do oxigênio e do dióxido de carbono presentes no interior dos frascos de cultivo das plantas de *A. strobilacea* não mostraram efeito sobre o alongamento das plantas. Contudo, pôde-se observar que as quantidades de CO<sub>2</sub> detectadas atingiram valores próximos de zero quando as plantas apresentaram o início do alongamento. Medidas simultâneas de etileno e CO<sub>2</sub> do interior dos frascos poderiam contribuir para verificar a interação desses gases no alongamento.

Kitaya *et al* (2005), estudaram a velocidade da corrente de ar no interior de frascos contendo explantes de plantas de batata. Os dados foram comparados aos frascos sem plantas. Os autores concluíram que o ar presente no centro do frasco se

movimentou do sentido inferior para o superior, ou seja, em direção à tampa do frasco, e no sentido oposto em relação à parede do frasco. Segundo esse trabalho, a velocidade diminuiu com o aumento do tamanho da planta, comparativamente à velocidade do ar no frasco de cultura que foi significativamente menor quando comparado com o que ocorria na casa de vegetação e campo. O processo de difusão do ar pode ser baixo e limitante no processo fotossintético e de transpiração da planta, esses autores sugerem que o aumento do movimento do ar nos frascos promove o crescimento da planta através da fotossíntese e a respiração.

As diferenças observadas entre a concentração de oxigênio e dióxido de carbono referente ao tempo zero indicam que os níveis destes gases se alteraram durante a deposição do explante no meio nutritivo, o que pode ser atribuído ao fluxo de ar presente na capela de fluxo de ar laminar, que pode ter alterado a atmosfera interna do frasco.

Neste trabalho, verificou-se que houve uma diminuição na porcentagem de concentração de oxigênio que pode ter sido devida à respiração dos explantes (entre o tempo zero e 30 dias). Todavia, aos 45 dias, a quantidade de oxigênio aumenta progressivamente, enquanto que a de CO<sub>2</sub> declina (Tabela 3). Ao comparar esses dados aos fornecidos na tabela 4, verifica-se que os segmentos nodais visíveis a olho nu iniciam-se após 45 dias dos explantes terem sido depositados no meio nutritivo. Ou seja, evidenciando o crescimento celular. Os dados referentes aos 60, 75, 90 e 105 dias mostram que as plantas estão crescendo (alongando o eixo caulinar) e realizando a fotossíntese, pois os teores de CO<sub>2</sub> reduziram-se a zero. Aumento na concentração de oxigênio no interior dos frascos coincide com aumento da parte aérea e raízes, o que leva a sugerir que a produção de oxigênio seja devida ao aumento da fotossíntese realizada pela planta.

Jackson *et al.* (1991) trabalhando com *Gerbera jamesonii* e *Solanum tuberosum* constataram que em frascos fortemente vedados ocorre um maior acúmulo de dióxido de carbono em relação aos frascos frouxamente fechados e intermediários, e concomitantemente foi observado que as concentrações de oxigênio nos frascos fortemente fechados foram reduzidas em aproximadamente a metade. No cultivo *in vitro* de *A. strobilacea* houve o contrário, ao final de 105 dias pouco dióxido de carbono e maior quantidade de oxigênio foi detectada no interior dos frascos.

Tisserat *et al.* (2002), testando a influência de atmosfera modificada com O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, no crescimento, morfogênese e no metabolismo secundário de plantas de menta cultivadas *in vitro*, observaram que o crescimento foi maior nos diferentes níveis de

O<sub>2</sub> aplicados quando foi adicionado ao meio 10.000 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> quando comparado com a concentração de 350 μmol mol<sup>-1</sup> deste mesmo gás. Em relação à concentração de O<sub>2</sub>, aumento no crescimento e morfogênese foi observado nas plantas que cresciam em concentrações de ≥ 21 % de oxigênio. Lembrando que a concentração de oxigênio na atmosfera terrestre é de 21 % (Larcher 2006).

Neste estudo podemos concluir que o tipo de tampa utilizada na vedação dos frascos de cultivo *in vitro* de *A. strobilacea* pode alterar o fenótipo das plantas, essa alteração não tem relação direta com o conteúdo de dióxido de carbono e oxigênio, não se observa grande acúmulo desses gases durante o período de cultivo observado. Contudo, as avaliações dos teores desses gases puderam ser relacionadas à fotossíntese realizada pelas plantas desenvolvidas a partir dos segmentos nodais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Arrabal, R., Amâncio, F., Carneiro, L.A., Neves L.J. & Mansur, E.** 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation* 11: 1081-1089.

**Barboza, S.B.S.C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J.B., Portes, T.A. & Souza, L.A.C.** 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 41 (2): 185-194.

**Belintanii, M.C., Lima, C.C., Brito, A.L., Santana, J.R.F. & Dornelles, A.L.C.** 2007. Efeito da ventilação *in vitro* na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição. *Revista Brasileira de Biociência* 5: 1098-1100.

**Buddendorf-Josten, J.M.C. & Woltering, E.J.** 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 15: 1-16.

**Carretero, C.L., Cantos, M., García, J.L. & Trancoso, A.** 2007. *In vitro* – *ex vitro* salt (NaCl) tolerance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43: 364-369.

Cavassan, O. 2002. O cerrado do estado de São Paulo. In: A. L. Klein (org.) *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois*. UNESP. Imprensa Oficial do Estado, São Paulo. 93 - 106.

**Chen, U., Hsia, C., Yeh, M., Agrawal, D.C. & Tsay, H.** 2006. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kanoi* – an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 42: 128-133.

**Figueiredo, M.L.** 2003. Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de Bromeliaceae nativas do Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

**Grattapaglia, D., Machado, M.** 1998. Micropropagação In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-CBAB 533-568.

**Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davis Junior, F.T & Geneve, R.L.** 2002. Plant propagation: Principles and Practices 7 ed. New York, Englewood Clippis.

**Jackson, M.B., Abbott, A.J., Belcher, A.R., Hall, K.C., Butler & Cameron, J.** 1991. Ventilation in plant tissue culture and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. Annal of Botany 67: 229-237.

**Jensen, E., Eilertsen, S., Ernsten, A., Juntilla, O. & Moe, R.** 1996. Thermoperiodic control of stem elongation and endogenous gibberelins in *Campanula isophylla*. Journal of Plant Growth Regulation 15: 167-171.

**Kanashiro, S.** 2005. Nitrogenio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith *in vitro*. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz. Universidade de São Paulo.

**Kitaya, Y., Ohmura, Y., Kubota, C. & Kozai, T.** 2005. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 251-257.

**Kurepin, L.V., Emery, R.J.N., Pharis, R.P. & Reid, D.M.** 2007. The interaction of light quality and irradiance with gibberellins, cytokinins and auxin in regulating growth of *Helianthus annuus* hypocotylus. Plant, Cell and Environment 30: 147-155.

**Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2003. Obtenção de bromélia *in vitro* como estratégia de preservação. Vidália 1(1): 57-62.

**Nour, K.A. & Thorper, T.A.** 1994. The effect of the gaseous state on bud induction and shoot multiplication *in vitro* in eastern white cedar. *Physiology Plantarum* 90: 163-172.

**Nhut, D.T., Le, B.V., Fukai, S., Tanaka, M. & Van, T.T.** 2001. Effects of activated charcoal, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regulation* 33: 59-65.

**Pierik, R.L.M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

**Predieri, S. & Rapparini, F.** 2007. Terpene emission in tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 91: 87-95.

**Radmann, E.B., Braga, E.J.B., Karan, M.A.L., Posada, M.A.C. & Peters, J.A.** 2001. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gysophila paniculata* L. *Revista Brasileira de Agrociência* 7 (3): 171-175.

**Raven, E.** 1996. *Biologia vegetal*. Editora Guanabara Koogan.

**Rech-Filho, A.R., Dal Vesco, L.L., Nodari, R.O., Lischka, R.W., Muller, C.V. & Guerra, M.P.** 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity e Conservation* 14: 1799-1808.

**Reitz, R.** 1983. Bromeliaceas e malária-bromélia endêmica. Itajaí. *Flora Ilustrada Catarinense*. Série 983.

**Rodrigues, T.M., Paiva, P.D.O., Rodrigues, J.G.C., Ferreira, C.A. & Paiva, R.** 2004. Desenvolvimento de mudas de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. *Ciência Agrotécnica*. Lavras 28(4): 757-763.

**Sharma, M.M., Jalootharia, D., Khanna, P. & Batra, A.** 2006. Na efficient *in vitro* mass propagation of a medicinally potent plant species *Vitex negundo* L. via nodal segments. *Phytomorphology* 56(1-2): 35-39.

**Smith, G.R.** 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Reports* 25: 1007-1015.

**Tadesse, M., Lommen, W.J.M. & Struik, P.C.** 2000. Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatisation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61: 59-67.

**Tamaki, V., Mercier, H. & Nievola, C.C.** 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34 (1): 69-73.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Acanthostachys strobilacea* é uma bromélia epífita ou saxícola que possui características morfológicas peculiares que as tornam atrativas do ponto de vista ornamental, apesar de ser explorada comercialmente, não foram encontrados registros sobre a produção desta espécie em escala comercial. O cultivo *in vitro* é uma técnica bastante utilizada na multiplicação de plantas ornamentais uma vez que viabiliza a produção de clones de um fenótipo de interesse, e as plantas produzidas são de ótima qualidade fitossanitária aumentando o valor de mercado da espécie. O presente estudo se propôs a estabelecer um protocolo de cultivo para *A. strobilacea* de modo a viabilizar sua exploração comercial.

O primeiro obstáculo a ser superado foi o estabelecimento das sementes em condições assépticas, pois as mesmas são envoltas por uma mucilagem que além de propiciar a proliferação de microorganismos no interior dos frascos de cultivo são atrativas para a avifauna do seu ambiente natural, portanto as sementes maduras são escassas no campo. Fundamentando-se em um trabalho com *Aechmea nudicaulis*, espécie de bromélia cujas sementes também possuem mucilagem foi estabelecido um protocolo de desinfestação para sementes de *A. strobilacea* através da utilização de uma solução de ácido clorídrico, além das substâncias usuais como etanol, hipoclorito de sódio e detergente, assim obtivemos êxito nas taxas de contaminação.

Uma vez estabelecido o melhor método de desinfestação superficial das sementes, e controlados as taxas de contaminação, o passo posterior seria a escolha do melhor meio nutritivo para o crescimento das plantas, a solução nutritiva mais utilizada para micropropagação de bromélias é aquela formulada por Murashige & Skoog (MS) no ano de 1962, entretanto, modificações na formulação original são recomendadas para se atender necessidades específicas de cada espécie, assim tendo como base teórica um trabalho desenvolvido com *Ananas comosus*, sementes de *A. strobilacea* foram cultivadas em soluções diluídas de MS. Este experimento resultou em algo inusitado para Bromeliaceae, algumas plantas apresentaram alongamento do seu eixo caulinar, aumentando as distâncias dos segmentos internodais, facilitando o isolamento dos nós.

Uma vez isolados e subcultivados em novo meio nutritivo, estes segmentos nodais deram origem a novas plantas sem a necessidade de utilização de reguladores de crescimento, muito comum no cultivo de fragmento de tecidos vegetais na indução de novas plantas. Entretanto a produção de nós não era uniforme, apesar de

potencializar a propagação desta planta, havia necessidade de investigar o que poderia uniformizar a produção de segmentos nodais.

Uma das hipóteses testadas foi a intensidade luminosa na qual os frascos permaneciam durante o cultivo *in vitro* da espécie, a partir de medições da intensidade na sala de cultura onde as plantas cresceram durante o estudo nutricional associado a registros de intensidade luminosa para bromélias encontrada na literatura, foi estabelecido o intervalo de intensidade onde foram testadas as sementes de *A. strobilacea*. Foi identificado que menor intensidade luminosa induzia ao alongamento do eixo caulinar nas plantas, porém intensidade luminosas maiores também induziam o alongamento, sugerindo que outros fatores estavam envolvidos no fenótipo.

Segmentos nodais subcultivados também apresentam alongamento do eixo caulinar e, assim como as sementes, a produção não foi uniforme, investigações nos levaram a outra hipótese, o alongamento caulinar poderia gerar ao longo do caule razões de concentração endógenas hormonais diferenciadas que estaria influenciando as alterações morfológicas das plantas regeneradas via segmento nodal. Esta hipótese foi testada e surgiram diferenças em relação à posição que o nó se localizava no caule quando isolado.

As investigações continuaram e surgiu a hipótese de outro fator abiótico, além da luz, que seria o acúmulo de gases no interior dos frascos de cultivo, diferentes tipos de tampa utilizadas para fechar os frascos de cultura foram testados e observou-se que em frascos cuja tampa dificultava as trocas gasosas entre o interior do frasco e o ambiente externo propiciou o alongamento caulinar nas plantas.

Um dos gases que poderia naquele momento estar envolvido era o etileno, foi encontrado um trabalho realizado em 1994 com *Arabidopsis thaliana*, espécie bastante utilizada como modelo fisiológico, em que estas plantas apresentavam alongamento do eixo caulinar quando cultivadas *in vitro* na luz na presença de etileno, é muito comum este fitorregulador se acumular no interior dos frascos de cultivo em concentrações fisiologicamente ativas que podem alterar o crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas. Assim, foi realizado um teste com sementes onde foi aplicado este fitorregulador e um potente inibidor de receptor de etileno, as respostas foram muito sutis levando a reestruturar o experimento aumentando-se a dose de etileno e do inibidor e desta vez em segmentos nodais, uma vez que o mesmo foi estabelecido como explante para cultivo da espécie. Os resultados mostraram que há relação entre o etileno e o alongamento do caule,

coletas de oxigênio e dióxido de carbono foram realizadas nos frascos bem fechados de modo a investigar uma possível relação entre os gases, entretanto não foi observada relação direta destes gases no alongamento do eixo caulinar de *A. strobilacea*.

Plantas com eixo caulinar alongado são utilizadas como matrizes para retirada de explante para obtenção de novas plantas e aquelas que não apresentam eixo caulinar alongado são transferidas para condições *ex vitro* onde sobrevivem com sucesso, estudos nutricionais mostraram que em condição de casa de vegetação estas plantas requerem soluções concentradas quando comparadas com o cultivo *in vitro*.

Estudos na quantificação do etileno no interior dos frascos de cultivo bem como dos teores endógenos de fitorreguladores poderiam indicar como este alongamento ocorre. Estudos anatômicos são fundamentais na compreensão das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento da espécie. Além de um eficiente protocolo de propagação para *A. strobilacea*, este trabalho propõe um novo modelo para estudos fisiológicos com ênfase no etileno.