

EFEITO DE ANA, 6-BA E ÁGAR NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *AECHMEA BLANCHETIANA* (BAKER) L.B. SMITH, BROMÉLIA NATIVA DA MATA ATLÂNTICA

Maíra Soares Galvanese¹
Armando Reis Tavares²
Francismar Francisco Alves Aguiar²
Shoey Kanashiro²
Edson Paulo Chu²
Giulio Cesare Stancato³
Isabel Cristina Fialho Harder³

RESUMO

Plantas da espécie *Aechmea blanchetiana* obtidas por sementeira *in vitro* foram cultivadas em meio MS suplementado com os reguladores vegetais 6-BA e ANA nas concentrações de 0,2; 1,0; e 5,0 mg L⁻¹, em meio líquido e semi-sólido (6,0 g L⁻¹ de ágar). O maior número de brotações foi obtido no tratamento com 5,0 mg L⁻¹ de ANA + 5,0 mg L⁻¹ de 6-BA em meio líquido, e com 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 1,0 mg L⁻¹ de 6-BA no meio semi-sólido. Os resultados da massa de matéria seca mostraram que quanto maior o número de brotos, menor a massa de matéria seca. A variável comprimento das folhas tende a diminuir quando se aumenta a concentração de ANA, e o tamanho das raízes apresentou incremento significativo quando houve aumento nas concentrações de ANA.

Palavras-chave: Bromeliaceae, *Aechmea*, cultivo *in vitro*, reguladores de crescimento de plantas.

ABSTRACT

EFFECT OF NAA, 6-BA AND AGAR ON MICROPROPAGATION OF *AECHMEA BLANCHETIANA*, AN ATLANTIC RAINFOREST BROMELIAD

Seeds of the species *Aechmea blanchetiana* were germinated *in vitro* and the resulting plantlets were cultivated in MS medium supplemented with the combinations of 6-BA and NAA (0.2; 1.0 and 5.0 mg L⁻¹), in liquid and semi-solid medium (6.0 g L⁻¹ agar). All treatments were effective on seed disinfecting. The largest shoot number in liquid medium was obtained in the treatment with 5.0 mg L⁻¹ NAA + 5.0 mg L⁻¹ 6-BA, while the treatment with 1.0 mg L⁻¹ NAA + 1.0 mg L⁻¹ 6-BA showed the largest shoot number in the semi-solid medium. The results obtained by the dry matter weight showed that the higher the number of shoots, the lower the dry matter. The variable leaf length tended to decrease with increase in NAA concentration and the root showed the opposite trend, with the variable size increasing significantly with the highest NAA concentration.

Key words: Bromeliaceae, *Aechmea*, *in vitro* culture, plant growth regulators.

¹ Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica. São Paulo, SP.

² Instituto de Botânica. São Paulo, SP. E-mail: atavares2005@yahoo.com.br

³ Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, SP

INTRODUÇÃO

No Brasil, as bromélias crescem em profusão, especialmente na Mata Atlântica. Seu cultivo pode trazer vários benefícios, como a redução do extrativismo predatório de bromélias nativas, permitindo a conservação destas no seu ambiente natural. A família Bromeliaceae apresenta aproximadamente 2.500 espécies, cuja ocorrência limita-se ao continente americano, com exceção apenas da espécie *Pitcairnia feliciana*, que é originária da África (Reitz, 1983).

Aechmea blanchetiana é uma planta herbácea epífita, perene, rizomatosa, robusta, com folhagem e inflorescências decorativas de 60 a 90 cm de altura, nativa do Brasil. As folhas são longas, rijas, laminares, verde-claras, côncavas, basais e em roseta, sem espinhos nas margens (Lorenzi & Souza, 1998). Leme & Marigo (1993) relatam que *A. blanchetiana* vem sendo criminosamente extraída de seu ambiente natural para atender à demanda do mercado de plantas ornamentais.

A composição e a concentração de auxinas e citocininas no meio de cultura são fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Os meios nutritivos podem ser líquidos ou semi-sólidos, e concentrações ótimas de sais no meio líquido são diferentes das do meio semi-sólido, em virtude das restrições de velocidade de difusão e de gradientes de nutrientes (meio sólido) e oxigênio necessários para a respiração dos explantes em meio líquido (Caldas et al., 1998).

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos dos reguladores vegetais ácido á-naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (6-BA) e ágar no desenvolvimento *in vitro* da espécie *A. blanchetiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Micropropagação da Seção do Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

Sementes de *A. blanchetiana* foram coletadas de plantas cultivadas no Bromeliário da Seção de Ornamentais/Instituto de Botânica. A extração das sementes se deu a partir de frutos maduros, com remoção do tegumento e lavagem das sementes, retirando-se a mucilagem. As sementes foram submetidas à desinfestação com solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa), nas concentrações de 25, 50 e 75% (v/v) e nos tempos de imersão de 10, 20 e 30 minutos (em

agitador orbital magnético), e à posterior lavagem em água deionizada estéril. O meio utilizado para a germinação das sementes foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado, com 20% das concentrações de macro e micronutrientes, acrescido das vitaminas tiamina.HCl (0,0002 g L⁻¹), ácido nicotínico (0,001 g L⁻¹) e piridoxina.HCl (0,001 g L⁻¹), glicina (0,004 g L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (agar-agar granulated, Merck) e o pH ajustado a 5,8.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas em meio estéril (20 mL de meio nutritivo em recipientes de 180 mL, vedados com filme de polietileno) e, em seguida, transferidas para sala de cultivo, sob fotoperíodo de 12 horas, 36,0 µmol m⁻² s⁻¹ (3 lâmpadas de 40 W – OSRAM/luz do dia especial) e temperatura ambiente de 26±2 °C. As avaliações das porcentagens de germinação foram realizadas após 30 dias de cultivo.

As plantas obtidas em germinação *in vitro* (aproximadamente 2,5 cm) foram utilizadas no estudo da ação dos reguladores de crescimento vegetais no desenvolvimento *in vitro* da espécie. Os tratamentos consistiram da combinação de ANA (0,2; 1,0; e 5,0 mg L⁻¹) e 6-BA (0,2; 1,0; e 5,0 mg L⁻¹) adicionados aos meios de cultivo MS líquido (L, sem adição de ágar + 30 g L⁻¹ de sacarose) e semi-sólido (S, com a adição 6 g L⁻¹ de ágar + 30 g L⁻¹ de sacarose).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3x2, utilizando-se 10 repetições com 5 parcelas (tubos) contendo 3 plantas. O meio líquido permaneceu estacionário (sem agitação). A esses meios (L e S) foram adicionados os fitoreguladores ANA e 6-BA nas concentrações de 0,2; 1,0; e 5,0 mg L⁻¹, totalizando 18 tratamentos. Para a comparação das médias de todas as variáveis, foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, tendo sido as médias transformadas em $(x+10)^{1/2}$.

A avaliação dos tratamentos foi realizada após 180 dias, quando foram analisadas as seguintes variáveis: comprimento da maior folha (CF), comprimento médio das raízes (CR), número médio de brotos e massa da matéria seca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as combinações de hipoclorito de sódio (25, 50 e 75%) usadas no experimento, nos períodos de 10, 20 e 30 minutos, foram eficientes na desinfestação das sementes, não se observando contaminações e propor-

cionando 100% de germinação. As plantas visualmente não apresentaram alterações morfológicas que indicassem diferenças entre os tratamentos. Pickens *et al.* (2003) utilizaram diversos métodos para a desinfestação de sementes de *Tillandsia eizii*, obtendo em todos os tratamentos índice de descontaminação superior a 90%, e de germinação entre 64 e 94% das sementes inoculadas *in vitro*. Segundo Pompelli & Guerra (2005), a utilização de sementes como explante inicial permite a manutenção da diversidade genética observada nas populações naturais, auxiliando na conservação de bromélias ameaçadas de extinção.

O número de brotos emitidos pelas plantas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, foi influenciado pela presença ou ausência de ágar no meio (meio semi-sólido ou líquido) e pelas concentrações dos reguladores de crescimento ANA e 6-BA (Tabela 1).

Os números de brotos emitidos nos tratamentos ANA 1,0 mg L⁻¹ + 6-BA 1,0 mg L⁻¹ e ANA 5,0 mg L⁻¹ + 6-BA 5,0 mg L⁻¹ diferiram quanto à presença ou ausência de ágar no meio; no primeiro, o meio semi-sólido foi o mais eficiente no estímulo à brotação e, no segundo, o meio líquido foi o mais eficiente; nos outros tratamentos não ocorreram diferenças significativas (Tabela 1).

Os meios nutritivos podem ser líquidos ou sólidos, e a cultura em meio líquido normalmente exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração dos explantes (Heller *et al.*, 1968). Em condições naturais, as bromélias absorvem água e nutrientes principalmente pela parte aérea, através dos pelos absorventes das folhas, denominados de pêlos peltados (Raven *et al.*, 1999). Isso explica e possivelmente justifica, segundo Kampf (1995), a otimização de muitas espécies de bromélias na absorção de nutrientes em meio líquido. Rech Filho *et al.* (2005) obtiveram a multiplicação de

Vriesea reitzii, utilizando o meio MS líquido suplementado com os reguladores NAA (2 µM) e BA (4 µM). Segundo os autores, o tipo e o tamanho dos explantes foram determinantes da capacidade de proliferação da espécie, e os explantes de 1,5 cm tiveram maiores taxas de proliferação em relação aos de 0,5 cm de comprimento.

Paiva *et al.* (1999) estudaram a relação entre concentrações de ágar (0,0; 0,35; 0,7 e 1,05%) e pH do meio (4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 e 7,0) no desenvolvimento de plantas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev. cv. Orange Reagen) *in vitro*, e observaram que o número e o tamanho de brotos não foram afetados pelos tratamentos. Nos meios líquidos, tiveram que utilizar pontes de Heller para a sustentação do explantes, aumentando a necessidade de mão-de-obra para o cultivo. Em meios semi-sólidos, os explantes ficaram inclinados ou sobrenadantes, ocorrendo a brotação no sentido perpendicular ao explante, dificultando o crescimento e o enraizamento nas fases seguintes.

No meio semi-sólido, nas concentrações de 0,2 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ de ANA, o aumento na concentração de 6-BA não ocasionou aumento significativo no número de brotos. Na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA, o aumento na concentração de 6-BA de 0,2 mg L⁻¹ para 1,0 mg L⁻¹ levou a um acréscimo significativo no número de brotações. Em meio líquido, nas concentrações de ANA de 1,0 e 5,0 mg L⁻¹, o aumento da concentração de 6-BA, de 1,0 mg L⁻¹ para 5,0 mg L⁻¹, levou a um aumento significativo no número de brotos; na concentração de 0,2 mg L⁻¹ de ANA, o acréscimo de 6-BA não apresentou respostas (Tabela 1).

Para ANA em meio semi-sólido, o incremento na concentração não foi significativo para a variável número de brotações. Na concentração 0,2 mg L⁻¹ de 6-BA, houve um aumento significativo no número de brotos, quan-

Tabela 1. Efeito das combinações dos reguladores de crescimento ANA e 6-BA sobre o número médio de brotações em plantas de *Aechmea blanchetiana*, aos 180 dias de cultivo *in vitro*

ANA (mg L ⁻¹)	6-BA (mg L ⁻¹)					
	Meio Semi-sólido			Meio Líquido		
	0,2	1,0		5,0	0,2	1,0 5,0
0,2	6,82 a A a	8,49 a B a	22,58 a B a	3,92 a A a	2,96 a A a	4,56 a C a
1,0	9,02 b A a	50,42 a A a	62,00 a A a	6,60 b A a	4,26 b A b	44,65 a B a
5,0	8,34 a A a	31,66 a AB a	24,95 a B b	26,84 b A a	21,72 b A a	138,71 a A a
CV(%) 0,038						

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal, para comparação entre concentrações de 6-BA dentro de cada meio (semi-sólido ou líquido), maiúsculas na vertical, para comparação dentro das colunas, e em itálico para comparação entre concentrações de ANA dentro de cada tipo de meio (líquido ou sólido), não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

do se elevou a concentração de ANA de 0,2 mg L⁻¹ para 1,0 mg L⁻¹. Nas concentrações de 1,0 e 5,0 mg L⁻¹ de 6-BA, somente a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA apresentou resultado significativo (Tabela 1).

Os resultados obtidos nos meios líquidos e semi-sólidos, quanto ao número de brotos, diferiram dos obtidos por Naves (2001), que, trabalhando com *Alcantarea imperialis*, obteve 3,18 brotos explantes⁻¹, tendo como melhor tratamento o meio semi-sólido adicionado de 0,02 mg L⁻¹ de TDZ e 0,1 mg L⁻¹ de ANA. Valores semelhantes foram obtidos utilizando-se como explante segmentos de folhas nas espécies *Vriesea hieroglyphica* e *V. fosteriana*, cultivadas em meio Knudson, utilizando 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA para a indução de brotações (Mercier & Kerbauy, 1995). Piza et al. (2001), trabalhando com abacaxi, observaram que, à medida que as concentrações de BAP e ANA aumentavam, surgiu maior número de gemas mais vigorosas e com melhor conformação. Pompelli & Guerra (2005), estudando a micropropagação de *Dyckia distachya*, observaram maiores taxas de regeneração no meio MS líquido suplementado com NAA (2 µM), BA (4 µM) e PBZ (6 µM), resultando na indução de 133,58 brotos planta⁻¹ após 142 dias de cultivo. Entretanto, as maiores taxas de multiplicação (72,94) foram obtidas em meio MS geleificado suplementado com NAA (2 µM), BA (4 µM) e PBZ (6 µM), após 112 dias de cultura.

A massa da matéria seca das plantas (Tabela 2) não foi alterada nas concentrações de 0,2 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ de 6-BA no meio sólido, em todas as concentrações de ANA. Na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de 6-BA, a massa da matéria seca das plantas no tratamento 0,2 mg L⁻¹ de ANA foi superior à dos tratamentos 1,0 mg L⁻¹ e 5,0 mg

L⁻¹. Em meio líquido, a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA, ocorreu diminuição na massa de matéria seca nos tratamentos 0,2 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ de 6-BA, e a partir de 5,0 mg L⁻¹ de ANA no tratamento 1,0 mg L⁻¹ de 6-BA. A média da massa de matéria seca apresentou resultado inverso ao número de brotos, isto é quanto maior o número de brotos, menor a sua massa de matéria seca. Os resultados diferem daqueles obtidos por Naves (2001), que, estudando o crescimento *in vitro* de *A. imperialis*, observou que o tamanho final dos brotos parecia não concorrer com a quantidade de brotos emitidos. Mercier & Kerbauy (1992), estudando a micropropagação de *V. fosteriana*, observaram que combinações de ANA (0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹) e 6-BA (2,0; 5,0; 10,0 mg L⁻¹) estimularam o desenvolvimento de brotações em todas as combinações, porém não houve enraizamento em nenhum dos tratamentos. O enraizamento ocorreu após a transferência dos explantes para meio contendo 0,1 mg L⁻¹ de ANA, cessando a proliferação de brotos e restabelecendo o alongamento dos explantes.

A interação entre os reguladores vegetais não foi significativa para as variáveis CF e CR, sendo significativo somente para o fator ANA. Assim, os resultados obtidos pelo CF mostraram diminuição significativa desta variável, quando aumentaram as concentrações de ANA. A variável CR não apresentou resposta com o aumento na concentração de ANA de 0,2 mg L⁻¹ para 1,0 mg L⁻¹, porém o aumento na concentração de 1,0 mg L⁻¹ para 5,0 mg L⁻¹ levou à diminuição do comprimento médio de raiz (Tabela 3).

Os resultados do comprimento de folha estão de acordo com os obtidos por Naves (2001), em que o aumento da concentração de ANA diminuiu o tamanho médio das folhas, porém divergiram quanto ao tamanho das raízes,

Tabela 2. Efeito das combinações dos reguladores de crescimento ANA e 6-BA sobre a massa de matéria seca (g) em plantas de *A. blanchetiana*, aos 180 dias de cultivo *in vitro*

ANA (mg L ⁻¹)	6-BA (mg L ⁻¹)					
	Meio Semi-sólido			Meio Líquido		
	0,2	1,0	5,0	0,2	1,0	5,0
0,2	0,022 a A b	0,026 a A b	0,014 a A b	0,049 a A a	0,044 a A a	0,051 a A a
1,0	0,009 a A b	0,008 a B b	0,006 a A b	0,022 b B a	0,045 a A a	0,012 b B a
5,0	0,006 a A a	0,009 a B a	0,010 a A a	0,011 a B a	0,011 a B a	0,012 a B a
CV(%) 23,53						

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, para comparação entre concentrações de ANA dentro de cada meio (semi-sólido ou Líquido), maiúsculas para comparação dentro das colunas, na vertical e itálico para comparação entre concentrações de 6-BA dentro de cada tipo de meio (semi-sólido ou Líquido), não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Efeito do ácido á-naftalenoacético (ANA) sobre o comprimento da maior raiz (CR) e comprimento da maior folha (CF) em plantas de *Aechmea blanchetiana*, cultivadas *in vitro*

ANA (mg L ⁻¹)	CR (cm)	CF (cm)
0,2	1,71 a	5,76 a
1,0	1,32 b	3,43 b
5,0	0,65 b	2,08 c
CV(%)	2,236	3,482

Médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

que, no experimento, aumentou com o aumento da concentração de ANA, estabilizando-se após a concentração de 1,0 mg L⁻¹.

CONCLUSÕES

Todas as concentrações de hipoclorito de sódio (25, 50 e 75%) nos períodos de 10, 20 e 30 minutos foram eficientes, proporcionando 100% de germinação. Para a variável número de brotos no meio líquido, o tratamento 5,0 mg L⁻¹ de ANA e 5,0 mg L⁻¹ de 6-BA foi estatisticamente superior e, no meio semi-sólido, o tratamento 1,0 mg L⁻¹ de ANA e 5,0 mg L⁻¹ de 6-BA, mostrando uma tendência dos meios que continham maior concentração de citocininas, estimularem a formação de brotações. Para o comprimento da folha, os resultados corresponderam àqueles obtidos pela massa de matéria seca, em que plantas com menor número de brotos apresentaram maior crescimento. Quanto ao tamanho de raiz no meio líquido, os resultados não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. No meio sólido, os resultados mostraram que o tratamento 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 1,0 mg L⁻¹ de 6-BA foi superior ao tratamento 5,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,2 mg L⁻¹ de 6-BA.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA. p.87-132.

Heller R, Darpas A, Devillers P & Richez M (1968) Absorption et exsorption des tissus et fragments végétaux en culture. In: Les cultures de tissus de plantes. Paris, CNRS. p.149-69.

Kampf AN (1995) Argila expandida: um substrato para bromélias. Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias, 2:10-14.

Leme EMC & Marigo LC (1993) Bromélias na natureza, Rio de Janeiro, Marigo Comunicação Visual. 186p.

Lorenzi H & Souza HM (1998) Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras, 2 ed. Nova Odessa, Plantarum. 719p.

Mercier H & Kerbaux GB (1992) *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30:247-249.

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

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

Naves VC (2001) Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 76p.

Paiva PDO, Pasqual M & Paiva R (1999) Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação *in vitro* de crisântemo. Revista Ceres, 46:141-148.

Pickens KA, Affolter JM, Wolf JHD & Wetzstein HY (2003) Enhanced germination and seedling growth of *Tillandsia eizzi* *in vitro*. HortScience, 38:101-104.

Piza IMT, Lima GPP & Brasil OG (2001) Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. Revista Ceres, 48:681-690.

Pompelli MF & Guerra MP (2005) Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 5:117-124.

Raven PH, Evert RF & Eichhorn SE (1999) Biology of Plants, 6th ed. New York, W.H. Freeman and Company. 944p.

Rech-Filho A, Dal Vesco LL, Nodari RO, Lischka RW, Müller CV & Guerra MP (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 and Conservation, 14:1799-1808.

Reitz R (1983) Bromeliáceas e malária-bromélia endêmica. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. 808p.