

MARIA DE LOURDES FIGUEIREDO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS PARA PROPAGAÇÃO *IN VITRO*
DE TRÊS ESPÉCIES DE BROMELIACEAE NATIVAS DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

MARIA DE LOURDES FIGUEIREDO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS PARA PROPAGAÇÃO *IN VITRO*
DE TRÊS ESPÉCIES DE BROMELIACEAE NATIVAS DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de agosto de 2003.

Prof. Affonso Henrique L. Zuin

Prof^a. Milene Faria Vieira

Prof. Cláudio Coelho de Paula
(Conselheiro)

Prof. José Antonio Saraiva Grossi
(Conselheiro)

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Orientador)

Aos meus pais e irmãos
DEDICO

Ao meu companheiro e amigo Sidney
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao professor e amigo Sérgio Yoshimitsu Motoike, pela orientação, compreensão nos momentos mais difíceis e principalmente pela confiança.

Aos professores José Maria, Fernando Finger e Roberto Novais pelos conselhos e apoio.

Ao Professor Cláudio Coelho, pela doação do material botânico, pela bibliografia, pelo espaço físico no bromeliário e pelo trabalho em equipe.

A Ênio, André, Fumico, Carlito, Devid e demais colegas do bromeliário.

Aos(as) amigos(as) Cenira, Aurora, Virgínia, Gisela, Dorinha, Márcio, Alexandre, Ronaldo, Edson e demais estagiários do Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia.

Aos Amigos dos Departamentos de Biologia Vegetal (Natália, Danilo, Gilberto, Fábio, Adriano, Mercês, Marreco, Laudiene, Silvânia, Aguinaldo,, Wagner, etc.), Fitotecnia (Mara, Vicente, Geraldo, Diolino, Luciano, Valter, Hevilásio Andréa, Júlio, etc.) e Solos (Gualter, Hermelinda, Letúzia, etc).

Aos companheiros Tassiano Maxwell e Samuel Ângelo por me acolherem e pelo convívio fraterno.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, o meu respeito e gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I	5
REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Propagação natural das Bromeliáceas	6
2. Propagação <i>in vitro</i> de Bromeliáceas	6
2.1. Seleção e preparo da planta matriz	7
2.2. Fase de estabelecimento	7
2.3. Fase de multiplicação	8
2.4. Fase de alongamento e enraizamento	9
2.5. Fase de aclimatização	10
Referências	11
CAPÍTULO II	15
PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Acanthostachys strobilacea</i> (Schultes f.) Klotzsch	16
Resumo	16
2.1. Introdução	17
2.2. Material e métodos	17
2.2.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	18
2.2.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	18
2.2.3. Alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	19

2.2.4. Aclimatização	19
2.3. Resultados e discussão	20
2.3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	20
2.3.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	20
2.3.3. Alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	22
2.3.4. Aclimatização	22
2.4. Conclusões	24
2.5. Protocolo	25
2.5.1. Estabelecimento	25
2.5.2. Multiplicação	25
2.5.3. Alongamento e enraizamento	25
2.5.4. Aclimatização	26
Referências	27
CAPÍTULO III	28
PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Aechmea bambusoides</i> L. B. Smith & Reitz	29
Resumo	29
3.1. Introdução	29
3.2. Material e métodos	30
3.2.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	31
3.2.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	31
3.2.3. Alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	32
3.2.4. Aclimatização	32
3.3. Resultados e discussão	33
3.3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	33
3.3.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	33
3.3.3. Alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	35
3.3.4. Aclimatização	35
3.4. Conclusões	37
3.5. Protocolo	38
3.5.1. Estabelecimento	38
3.5.2. Multiplicação	38
3.5.3. Alongamento e enraizamento	39
3.5.4. Aclimatização	39

Referências	40
CAPÍTULO IV	42
PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Quesnelia quesneliana</i> (Brongniart) L. B. Smith	43
Resumo	43
4.1. Introdução	44
4.2. Material e métodos	44
4.2.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	45
4.2.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	45
4.2.3. Alongamento e enraizamento <i>in vitro</i>	46
4.2.4. Aclimatização	46
4.3. Resultados e discussão	47
4.3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	47
4.3.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	47
4.3.3. Alongamento e enraizamento	49
4.3.4. Aclimatização	49
4.4. Conclusões	51
4.5. Protocolo	52
4.5.1. Estabelecimento	52
4.5.2. Multiplicação	53
4.5.3. Alongamento e enraizamento	53
4.5.4. Aclimatização	53
Referências	54
CONCLUSÕES	56

RESUMO

FIGUEIREDO, Maria de Lourdes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003, **Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de bromeliaceae nativas do Brasil**. Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Conselheiros: Cláudio Coelho de Paula, José Antonio Saraiva Grossi e José Maria Moreira Dias.

A destruição dos ambientes naturais das bromeliáceas, aliada à coleta indiscriminada, tem levado muitas espécies nativas à extinção. No Estado de Minas Gerais já se encontram listadas 48 espécies ameaçadas. Diante disso foram selecionadas três espécies nativas deste Estado (*Acanthostachys strobilacea*, *Aechmea bambusoides* e *Quesnelia quesneliana*) para o desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro*. No laboratório, as sementes passaram por um processo de desinfestação e foram estabelecidas *in vitro*. Na fase de multiplicação *in vitro*, para cada espécie foi feito um experimento, testando-se cinco concentrações de BAP (0, 10, 20, 40 e 80 μM) e duas concentrações dos sais minerais de MS (50% e 100%). Avaliou-se o número de brotações formadas, a altura média das brotações e a presença de raízes nas brotações. Em seguida, as brotações foram transferidas para meio de alongamento e enraizamento. Na fase de aclimatização, as plântulas foram submetidas a experimentos distintos. No caso de *A. strobilacea* as plântulas tiveram as raízes removidas e foram separadas em três grupos: 1 (10 a 20 mm), 2 (30 a 40 mm) e 3 (50 a 60 mm). As plântulas de *A. bambusoides* foram separadas em dois grupos: 1 (20 a 40 mm) e 2 (acima de 4,1 a 60 mm). Testou-se como substrato xaxim (*Dicksonia sellowiana*) e aguapé (*Eichhornia crassipes*) nessas duas espécies. Para *Q. quesneliana*, selecionadas com 20 a 30 mm de altura, testou-se xaxim, aguapé e a mistura destes (1:1). Verificou-se que o tratamento de desinfestação das sementes propiciou percentagem de contaminação menor que 1%, para as três espécies. O número de brotações formadas, na etapa de multiplicação, foi maior na concentração estimada de 26,8 μM de BAP para *A. strobilacea*; 26,11 μM para *A. bambusoides* e 22,15 μM para *Q. quesneliana*. No entanto, a altura média das brotações diminuiu

com o aumento da concentração de BAP. A formação de raízes só foi observada na ausência de BAP, para todas as espécies estudadas. O meio MS com a metade da concentração dos sais foi eficiente na multiplicação, no alongamento e no enraizamento de *A. strobilacea* e *Q. quesneliana*. Para *A. bambusoides* melhores resultados foram conseguidos com o meio MS não modificado. O aguapé pode ser utilizado como substrato para aclimatização das três espécies, sendo que, para *Q. quesneliana*, o aguapé deve ser misturado com areia na proporção 1:1.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Maria de Lourdes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2003, **Development of protocols for *in vitro* propagation of three species of bromeliaceae native from Brazil**. Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Committee Members: Cláudio Coelho de Paula, José Antonio Saraiva Grossi and José Maria Moreira Dias.

The destruction of the habitats of the bromeliaceae, together with the indiscriminate gathering, has threatened many native species to extinction level. Today In the state of Minas Gerais 48 species are listed as endangered. Considering this, three species (*Acanthostachys strobilacea*, *Aechmea bambusoides* and *Quesnelia quesneliana*) native to this state were selected for the establishment of *in vitro* propagation protocols. In the laboratory, the seeds underwent a disinfestation process and were established *in vitro*. In the *in vitro* multiplication phase an experiment was carried out with each one of the selected species for testing five BAP concentrations (0, 10, 20, 40 e 80 μ M) and two concentrations of mineral salts in the MS culture medium (50% e 100%). Evaluations were made through the produced axillary shoots, considering their number, mean height and rooting. After these evaluations, the shoots were transferred to the elongation and rooting medium. In the acclimatization phase the plantlets underwent different experiments. In the case of *A. strobilacea* the plantlets had their roots removed, then separated in three groups: 1 (10 to 20 mm), 2 (30 to 40 mm) and 3 (50 to 60 mm). The plantlets of *A. bambusoides* were separated in two groups: 1 (20 to 40 mm) and 2 (41 to 60 mm). These two species were tested on two substrates: xaxim (*Dicksonia sellowiana*) and water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*). For the experiment with *Q. quesneliana*, the plantlets utilized had 20 to 30 mm of height and the substrates tested were xaxim, water-hyacinth and a mix of these (1:1). It was verified that the disinfestation treatment of the seeds provided contamination less than 1%, in all species. The numbers of axillary shoots produced in the multiplication phase were greater in the estimated concentrations of BAP: 26,8 μ M in *A. strobilacea*;

26,11 μM in *A. bambusoides* and 22,15 μM in *Q. quesneliana*. However, the mean height of axillary shoots decreased with increasing BAP concentration. In all species rooting occurred only in the absence of BAP. The MS medium with half of the salt concentrations was efficient in the multiplication, elongations and rooting of *A. strobilacea* and *Q. quesneliana*. For *A. bambusoides* the best results were obtained with the unmodified MS medium. The water-hyacinth may be utilized as substrate in the acclimatization of the three species, but in the case of *Q. quesneliana* this substrate must be mixed with sand in an 1:1 proportion.

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae pertence à classe Monocotyledoneae e está subdividida em três subfamílias: Bromelioideae, Pitcarnioideae e Tillandsioidae (Smith e Downs, 1974). No Brasil podem ser encontrados mais de 73% dos gêneros de Bromeliaceae catalogados até o momento e mais da metade das 3.000 espécies já classificadas (Paula e Silva, 2001). Em todos os ecossistemas brasileiros são encontradas espécies desta família, que possuem diferentes hábitos de crescimento: rupícolas, saxícolas, terrestres e epífitas, sendo a Mata Atlântica o ecossistema com maior diversidade de bromélias, com vários gêneros endêmicos (Leme e Marigo, 1993).

Entretanto, a destruição dos habitats, aliada à coleta indiscriminada dessas espécies, tem levado muitas espécies nativas à extinção. Atualmente, um total de 15 espécies são citadas na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção (IBAMA, 1992), sendo que a região Sudeste, a mais degradadas de todo o país, é o centro de diversidade da Subfamília Bromelioideae (Leme e Marigo, 1993), a que apresenta maior número de gêneros (Luther, 2000). Em Minas Gerais, se listam 48 espécies da família em risco de extinção (Mendonça e Lins, 2000).

Na Zona da Mata Mineira, a espécie *Acanthostachys strobilacea* (Schultes f.) Klotzsch ocorre exclusivamente como epífita, em grandes árvores, localizadas geralmente na bifurcação dos troncos, sob luz difusa. O desmatamento destas grandes árvores levou a uma redução drástica na

população desta espécie de tal forma que raramente é encontrada nos fragmentos florestais ainda existentes nesta região (Paula, 2003).

A espécie *Aechmea bambusoides* L. B. Smith & Reitz ocorre no Vale do Paraíba, nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, onde se localizavam em árvores isoladas e remanescentes da Floresta Atlântica Sub-caducifólia, que recobria totalmente a região (Paula, 2003). Esta espécie encontra-se na lista das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais (Mendonça e Lins, 2000), não ocorrendo em nenhuma área de unidade de conservação, tornando-se mais susceptível ao processo de extinção, em decorrência do corte de árvores para ampliação de pastagens e principalmente, devido as queimadas no período seco (Paula, 2003).

A espécie *Quesnelia quesneliana* (Brongniart) L. B. Smith, apesar de ainda não estar na lista das espécies ameaçadas de extinção, é uma planta cujas populações nativas vêm sofrendo grande pressão degradativa, por ocorrerem em área de grande ação antrópica. No Rio de Janeiro esta espécie ocorre, preferencialmente, na região litorânea, em áreas de Restinga, onde o ecossistema encontra-se severamente degradado e com os fragmentos da vegetação restante sendo alvo da especulação imobiliária (Smith e Downs, 1979).

O desenvolvimento de pesquisas visando a conservação das espécies em seus habitats, bem como o desenvolvimento de tecnologia de produção dessas espécies, evitando seu extrativismo, é fundamental para a conservação das Bromeliaceae no Brasil. Diante disso a UPCEB (Unidade de Pesquisa e Conservação de Bromeliaceae) vem estimulando pesquisas com espécies da subfamília Bromelioideae, ocorrente na região Sudeste.

Dentre estas espécies, foram selecionadas as três espécies citadas, de ocorrência em diferentes áreas da região de Minas Gerais, para o desenvolvimento deste trabalho de propagação *in vitro*. Esta técnica de propagação pode ser empregada com eficiência na preservação da Bromeliaceae. No entanto, a maioria das pesquisas publicadas com espécies desta família refere-se ao abacaxi (Mathews e Rangan, 1979; Cote et al., 1991; Almeida et al., 1997; Guerra et al., 1999; Praxedes et al., 2000).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos para propagação *in vitro* de *A. strobilacea*, *A. bambusoides* e *Q. quesneliana*,

subsidiando projetos de reintrodução, bem como a sua produção em escala comercial.

Referências

Almeida, W. A. B. de.; Matos, A. P. de.; Souza, A. da S.: Effects of benzilaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). In: Martin-Prével, P.; Hugon, R. (eds) **Proceedings of the second international pineapple symposium**, Trois-Ilets, Martinica, 1995, Acta Horticulturae, 1997.

Cote, F.; Domergue, R.; Folliot, M.; Bouffin, J.; Marie, F.: Micropropagation *in vitro* de l'ananas. **Fruits** número spécial Ananas: 359-366. 1991.

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

IBAMA: **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Portaria Nº 37-N** in <http://home.techno.com.br/vidagua/informa/plan-textin.htm>, 3 de abril de 1992.

Leme, E. M. C.; Marigo, L. C.: **Bromeliads in the Brazilian wilderness**. Marigo Comunicação Visual, Rio de Janeiro. 183p. 1993.

Luther, H. E.: **An alphabetical list of bromeliad binomials**. Bromeliad Society International, Sarasota, Florida. 120p. 2000.

Mathews, V. H.; Rangan, T. S.: Multiple plantlets in lateral bud and leaf explants *in vitro* cultures of pineapple. **Scientia Horticulturae** 11: 319-328. 1979.

Mendonça, M. P.; Lins, L. V.: **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Fundação Biodiversitas, Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte. 157p. 2000.

Paula, C. C. de. **Comunicação pessoal**. Departamento de biologia vegetal – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2003.

Paula, C. C. de.; Silva, H. M. P. da.: **Cultivo prático de bromélias**. Editora UFV, Viçosa. 73p. 2001.

Praxedes, S. C.; Silva Jr, A. F.; Figueirêdo, F. L.; Figueiredo, M. L.; Câmara, F. A. A.; Oliveira, O. F.: Efeito do ANA e do AIA no estiolamento *in vitro* do abacaxi cv. Pérola **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Fortaleza, 2000, Embrapa / Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000.

Smith, L. B.; Downs, R. J.: **Flora Neotropica**. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Collier-Macmillan Publishers, Nova Iorque. 1-658p. 1974.

Smith, L. B.; Downs, R. J.: **Flora Neotropica**. Bromelioideae (Bromeliaceae). The New York Botanical Garden, Nova Iorque. 1491-2142p. 1979.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. Propagação natural das Bromeliáceas

A propagação das bromeliáceas pode ocorrer tanto pela via seminífera ou sexuada, quanto pela propagação vegetativa natural, a partir de brotações axilares. A multiplicação de bromélias por via seminífera, tem a desvantagem da grande variabilidade genética, o que impossibilita a manutenção nos descendentes das características genéticas de uma matriz híbrida ou variedade selecionada. De acordo com Van Dijck et al. (1988), este método de propagação possui a inconveniência de ser lento. Pelo processo vegetativo, as brotações surgem geralmente durante ou após a floração, e ao atingirem aproximadamente um terço do tamanho da planta mãe, poderão ser usadas como mudas (Paula e Silva, 2001). Este método é o mais utilizado para fins comerciais, porém tem as desvantagens do número limitado de brotações emitidas (Read e Szendrák, 1998) e da disseminação de doenças (Guerra et al., 1999). A vantagem da propagação por brotações reside no fato de se selecionar clones com características agronomicamente desejáveis. O mercado tem valorizado a introdução de novos clones e este tem sido um fator de concorrência entre os produtores de bromélias (Paula e Silva, 2001).

2. Propagação *in vitro* de Bromeliáceas

As técnicas de cultivo *in vitro* podem ser aplicadas tanto para a propagação sexuada, como para a assexuada. Na propagação sexuada, o uso de sementes permite a obtenção de maior número de plantas, que em termos

ecológicos pode ser utilizado na preservação de espécies ameaçadas (Zornig, 1996). Na propagação vegetativa, a cultura *in vitro* pode propiciar a obtenção de mudas uniformes, de alta qualidade e livres de doenças, além de permitir a multiplicação rápida e geneticamente confiável de novos cultivares e híbridos (Cote et al., 1991; Tombolato et al., 1998; Guerra et al., 1999). No entanto, falta protocolo adequado para cada espécie (Tombolato e Costa, 1998).

A propagação *in vitro* das bromeliáceas é constituída de cinco etapas distintas: seleção e preparação da planta matriz, estabelecimento, multiplicação, alongamento e enraizamento e aclimatização (Zornig, 1996). Cada etapa tem seus próprios problemas e particularidades que variam de acordo com a espécie e até mesmo entre variedades (George, 1993) e, dependendo da espécie, nem sempre todas estas etapas são necessárias (Grattapaglia e Machado, 1998; Tombolato e Costa, 1998). Cote et al. (1991) consideraram apenas três etapas no cultivo *in vitro* de abacaxi: a fase de cultura inicial, a fase de multiplicação e a fase de crescimento.

2.1. Seleção e preparo da planta matriz

A seleção de determinado tecido vegetal para ser utilizado como explante depende do objetivo da pesquisa. As matrizes de bromeliáceas selecionadas, segundo Zornig (1996), devem permanecer por dois a três meses sob cuidados de higiene e tratamentos regulatórios com fungicida e, ou antibióticos, em casa de vegetação.

2.2. Fase de estabelecimento

A fase de estabelecimento consiste na introdução *in vitro* do explante proveniente de ambientes naturais. Os explantes de bromélias podem ser sementes (Grossi, 2000; Koh e Davies Jr., 2001) ou tecidos (Hosoki e Asahira, 1980; Koh e Davies Jr., 1997), que são desinfestados com substâncias de ação germicida. As substâncias mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro acrescidos, algumas vezes, de espalhante adesivo para melhorar o contato deste com os tecidos. (Grattapaglia e Machado, 1998). Carneiro et al. (1999) desinfestaram sementes de *Neoregelia cruenta* com etanol 70% e

hipoclorito de sódio 5% mais 0,01% de Tween-80, por 30 minutos. Koh e Davies Jr. (2001) utilizaram 10% de Clorox por 10 minutos para desinfestar cápsulas de *Tillandsia fasciculata*. Na desinfestação de gemas de abacaxi, Cote et al. (1991), recomendaram usar hipoclorito de sódio com 6% de cloro ativo por 20 minutos e Guerra et al. (1999), utilizaram álcool 70% por um minuto, seguido por hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos. Hosoki e Asahira (1980) utilizaram hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por 10 minutos, para desinfestar gemas laterais de quatro espécies de bromeliáceas.

2.3. Fase de multiplicação

O principal objetivo da fase de multiplicação é produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo (Grattapaglia e Machado, 1998). Atualmente, não é possível indicar um meio de cultivo ideal para cada espécie (Tombolato e Costa, 1998). Na maioria dos trabalhos *in vitro* com bromeliáceas foi utilizada a formulação desenvolvida por Murashigue e Skoog, em 1962 (Cote et al., 1991; Tombolato et al., 1998; Carneiro et al., 1999; Guerra et al., 1999).

Na fase de multiplicação, as citocininas são utilizadas, freqüentemente, junto com auxinas, para estimular a divisão celular e controlar a morfogênese (George, 1993; Taiz e Zeiger, 2002). Quando adicionadas ao meio de cultivo, as citocininas quebram a dominância apical e induzem a proliferação de gemas axilares (Grattapaglia e Machado, 1998). As citocininas naturais não são muito utilizadas em laboratórios comerciais, devido ao seu custo, e entre as sintéticas, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a mais utilizada (George, 1993). O BAP, isoladamente ou juntamente com auxinas, adicionado ao meio de cultivo, tem sido eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies de bromeliáceas, sendo que as concentrações são específicas para cada vegetal (Tagliacozzo, 1998), podendo variar dentro da própria espécie (Almeida et al., 1997). Altas concentrações de BAP inibiu o processo de brotação em abacaxi (Kiss et al., 1995). Para abacaxi, Cote et al. (1991) recomendaram usar 2,2 µM de BAP no meio de cultivo. No entanto, Oliveira et al. (1996) observaram maior número de brotos para a cultivar *skay* quando utilizaram 4,44 µM de BAP. Para os cultivares Perolera e Primavera, o maior número de brotações foi obtido com

a combinação de 2,7 μM de ácido naftalenoacético (ANA) e 4,4 μM de BAP (Guerra et al., 1999). Para a cultivar *smooth cayenne*, Araújo et al. (1996) obtiveram maior número de brotos na ausência da auxina ANA e com 13,32 μM de BAP. Para *Neoregelia carolinae*, Tombolato et al. (1998) recomendam 10,74 μM de ANA mais 8,88 μM de BAP. Entretanto, para *N. cruenta* melhores resultados foram obtidos com 22 μM de BAP e 2,5 μM de ANA (Carneiro et al., 1999). Vários fatores podem estar relacionados com a quantidade requerida de regulador de crescimento exógeno, tais como, genética, tipo e idade fisiológica dos explantes, condições ambientais de cultivo e composição mineral do meio de cultivo (George, 1993; Grattapaglia e Machado, 1998).

O estado físico do meio também tem influência sobre a multiplicação de partes aéreas. Meios sólidos ou semi-sólidos são mais comuns em cultivo *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1998) porém, para o abacaxi, o meio líquido é mais eficiente (Mathews e Rangan, 1979; Guerra et al., 1999).

2.4. Fase de alongamento e enraizamento

O objetivo desta etapa é promover o alongamento das células e a formação de raízes adventícias nas brotações provenientes da multiplicação. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), tipos e concentrações de auxinas são as variáveis que, em geral, mais influenciaram o enraizamento. Neste caso, as partes aéreas em rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese. O meio MS sólido, sem regulador de crescimento é indicado para o abacaxi (Cote et al., 1991) e *Neoregelia carolinae* (Tombolato et al., 1998). No entanto, Cabral et al. (1983) recomendaram o meio líquido sem regulador de crescimento para o enraizamento de abacaxi, que possibilitou o crescimento mais rápido dos explantes. Porém, o cultivo em meio líquido requer alguma forma de aeração, mantendo as culturas em agitação ou empregando pontes de papel filtro para o suporte das partes aéreas (Grattapaglia e Machado, 1998). De modo geral, quando a relação citocina/auxina é favorável à auxina pode haver indução de raízes, caso contrário, há um estímulo da formação de

parte aérea (Hinojosa, 2000). Guerra et al. (1999) adicionaram ao meio MS líquido, para abacaxi, 2,7 μM de ANA e 4,4 μM de BAP.

O enraizamento *in vitro* pode também ser estimulado pela modificação da concentração dos sais nutrientes da formulação básica utilizada. Diluições de 1/2, 1/3 e 1/4 da concentração salina do meio MS são, freqüentemente, utilizados nesta fase, dependendo da espécie (Hasegawa, 1980; Valles e Boxus, 1987; Zornig, 1996).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o enraizamento é uma etapa que pode ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*. No enraizamento *in vitro*, as raízes são formadas em condições assépticas e a planta completa é transplantada para recipientes contendo substrato apropriado. Em condições *ex vitro*, todo o processo de enraizamento se dá em substrato. A opção por um dos sistemas depende, fundamentalmente, da qualidade das partes aéreas obtidas na multiplicação, da espécie e genótipo em questão, além da disponibilidade de infra estrutura adequada de casa de vegetação, câmara de nevoeiro ou telado.

2.5. Fase de aclimatização

O termo aclimatização é definido como a adaptação climática de um organismo, especialmente uma planta, que é transferido para um novo ambiente, sendo todo este processo realizado artificialmente (Costa, 1998). A etapa de aclimatização, na propagação *in vitro*, consiste na transferência da plântula da condição de laboratório, onde ela é heterotrófica, para o ambiente natural, quando a plântula torna-se autotrófica. Esta passagem é bastante crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de propagação *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1998). Costa (1998) citou que esta fase é muito delicada porque representa um estresse para a plântula e pelo perigo de infecções por fungos e bactérias. Neste sentido, a escolha do substrato é um fator relevante neste processo.

O substrato deve possuir, como características físicas, boa retenção de umidade e boa drenagem (Grattapaglia e Machado, 1998; Paula e Silva, 2001). Para o abacaxi, testes com misturas de substratos, tais como solo + xaxim + turfa e solo + xaxim + areia + húmus, têm comportamento semelhante quanto

ao índice de sobrevivência das plantas (Fauth et al., 1994). Apesar de existirem diversos substratos para o cultivo de bromélias, o xaxim é considerado o melhor de todos (Paula e Silva, 2001).

O xaxim é extraído da espécie *Dicksonia sellowiana* (Pr.) Hook, também conhecida popularmente por samambaiáçu, samambaiáçu-imperial e feto-arborescente. A *D. sellowiana* é uma planta com caule ereto, fibroso e espesso, possui 2 a 4 metros de altura e tem crescimento muito lento. Do seu caule são retirados os vasos de xaxim e, ainda o xaxim em pedaços, fibra ou pó é utilizado como substrato para o cultivo de diversas plantas (Lorenzi e Souza, 1999). No entanto, *D. sellowiana* está em processo de extinção devido à coleta indiscriminada (IBAMA, 1992; Demattê e Graziano, 2000; Stancato et al., 2000).

Uma possível alternativa para substituir o xaxim, no cultivo de bromeliáceas, é o aguapé, *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, uma planta aquática constituída de 95% de água (Pádua, 2003) e cujas raízes podem medir até um metro (Jardim de Flores, 2003). Esta planta multiplica-se rapidamente, podendo duplicar-se em duas semanas. Em função destas características, o aguapé pode prejudicar a navegabilidade dos rios, causar problemas em represas e danificar as turbinas de usinas hidroelétricas (Fermino et al., 2000; Greco, 2003). Dependendo do local no qual foi coletado, o aguapé seco pode ser usado como fertilizante e adubo para solos (Pádua, 2003). De acordo com Fermino et al., (2000) o aguapé seco após trituração, apresentou características físicas e química apropriadas para ser aproveitado como um econômico substrato para plantas hortícolas. Na UPCB (Unidade de Pesquisa e Conservação da Bromeliaceae) o aguapé, seco e dividido manualmente em pedaços, é utilizado na composição de mais de 90% dos substratos utilizados nas bromélias.

Referências

Almeida, W. A. B. de.; Matos, A. P. de.; Souza, A. da S.: Effects of benzilaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). In: Martin-Prével, P.; Hugon, R. (eds) **Proceedings of the second international pineapple symposium**, Trois-Ilets, Martinica, 1995, Acta Horticulturae, 1997.

Araújo, R. F.; Siqueira, D. L.; Couto, F. A. D. A.; Salomão, L. C. C.: Proliferação de brotos de abacaxi, *in vitro*, em concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) **Congresso Brasileiro de Fruticultura, 14 - Reunião Interamericana de Horticultura Tropical, 42 - Simpósio Internacional de Mirtáceas**, Curitiba, 1996, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1996.

Cabral, J. R. S.; Cunha, G. A. P.; Rodrigues, E. M.: **Propagação do abacaxi "in vitro"**, 2p. Embrapa, Cruz das Almas. 1983.

Carneiro, L. A.; Araújo, R. F. G.; Brito, G. J. M.; Fonseca, M. H. P. B.; Costa, A.; Crocromo, O. J.; Mansur, E.: *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. 1999.

Costa, A. M. M.: **Fisiologia da aclimação**. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) Micropropagação de plantas ornamentais, p. 63-67. Instituto Agrônomo, Campinas. 1998.

Cote, F.; Domergue, R.; Folliot, M.; Bouffin, J.; Marie, F.: Micropropagation *in vitro* de l'ananas. **Fruits** numéro spécial Ananas: 359-366. 1991.

Demattê, M. E. S. P.; Graziano, T. T.: Growth of *Dendrobium nobile* Lindl. as related with nutrient concentration in the growing media, 2000, Acta Horticulturae.

Fauth, A.; Tofol, M.; Silva, A. L.; Maraschin, M.: Aclimação de mudas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) resistentes à fusariose, cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura** 16: 7-12. 1994.

Fermino, M. H.; Kämpf, A. N.; Trentin, A. L.: Caracterização física e química de materiais alternativos para composição de substratos para plantas.: 2. Agupé, *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. In: Kämpf, A. N.; Fermino, M. H. (eds) **1º. Encontro Nacional Sobre Substrato para Plantas**, p. 249-255, Porto Alegre, 1999, Genesis, 2000.

George, E. F.: **Plant propagation by tissue culture, Part 1: The technology**. Exegetics Limited, Edington. 574p. 1993.

Grattapaglia, D.; Machado, M. A.: **Micropropagação**. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (eds) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, p. 183-260. Embrapa, Brasília. 1998.

Grossi, F.: **Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia** Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Tese de Doutorado. 116p. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2000.

Guerra, M. P.; Vesco, L. L. dal.; Pescador, R.; Schuelter, A. R.; Nodari, R. O.: Estabelecimento de m protocolo regenerativo para a micropropagação do

abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34: 1557-1563. 1999.

Hasegawa, P. M.: Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 105: 216-220. 1980.

Hinojosa, G. F.: **Auxinas**. In: Cid, L. P. B. (ed) Introdução aos hormônios vegetais, p. 15-53. Embrapa, Brasília. 2000.

Hosoki, T.; Asahira, T.: In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience** 15: 603-604. 1980.

IBAMA: **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Portaria Nº 37-N** in <http://home.techno.com.br/vidagua/informa/plan-textin.htm>, 3 de abril de 1992.

Jardim de Flores: **Aguapé, o "vegetal-água"** in <http://www.jardimdeflores.com.br/CURIOSIDADES/A24aguap%E9.htm>, 4 de junho de 2003.

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

Koh, Y. C.; Davies Jr., F. T.: Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. **Scientia Horticulturae** 70: 301-307. 1997.

Koh, Y. C.; Davies Jr., F. T.: Mutagenesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). **Scientia Horticulturae** 87: 225-240. 2001.

Lorenzi, H.; Souza, H. M. de.: **Plantas ornamentais no Brasil**. Instituto Plantarum, Nova Odesa. 1120p. 1999.

Mathews, V. H.; Rangan, T. S.: Multiple plantlets in lateral bud and leaf explants *in vitro* cultures of pineapple. **Scientia Horticulturae** 11: 319-328. 1979.

Oliveira, P. D. de.; Pasqual, M.; Kawamura, M. I.; Mayer, M. D. B.; Paiva, R.: Efeito do BAP, thidiazuron e sulfato de adenina na propagação *in vitro* de abacaxi. **Congresso Brasileiro de Fruticultura, 14 - Reunião Interamericana de Horticultura Tropical, 42 - Simpósio Internacional de Mirtáceas**, Curitiba, 1996, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1996.

Paula, C. C. de.: **Cultivo de bromélias**. Aprenda Fácil, Viçosa. 140p. 2000.

Paula, C. C. de.; Silva, H. M. P. da.: **Cultivo prático de bromélias**. Editora UFV, Viçosa. 73p. 2001.

Pádua, H. B. de.: **Aguapé - planta aquática no controle e remoção de nutrientes e outros compostos em piscicultura e pesqueiro** in <http://www.bhnet.com.br/~ecominas/edu/hidric/aguape.htm>, 4 de junho de

2003.

Read, P. E.; Szendrák, E.: Micropropagation and biotechnology of tropical and subtropical ornamentals. In: Drew, R. A. (ed) **International Symposium of Biotechnology of Tropical & Subtropical Species**, 1998, Acta Horticulturae, 1998.

Stancato, G. C.; Abreu, M. F.; Berton, R.; Kerbauy, G. B.: Cultivo de plantas de *dendrobium nobile* cv. Gilblank (Orchidaceae) em substratos contendo xaxim ou casca de coníferas. In: Kämpf, A. N.; Fermino, M. H. (eds) **1º. Encontro Nacional Sobre Substrato para Plantas**, p. 197-201, Porto Alegre, 1999, Genesis, 2000.

Tagliacozzo, G. M. D.: **Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro***. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) Micropropagação de plantas ornamentais, p. 58-62. Instituto Agronômico, Campinas. 1998.

Taiz, L.; Zeiger, E.: **Plant Physiology**. Sinauer Associates, Sunderland. 690p. 2002.

Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M.: **Micropropagação em plantas ornamentais**. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) Micropropagação de plantas ornamentais, p. 1-11. Instituto Agronômico, Campinas. 1998.

Tombolato, A. F. C.; Takebayashi, S. S. G.; Costa, A. M. M.; Quirino, E. A.: **Bromélia (*Neoregelia carolinae*)**. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) Micropropagação de plantas ornamentais, p. 22-24. Instituto Agronômico, Campinas. 1998.

Valles, M.; Boxus, P.: Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars. **Acta Horticulturae** 212: 611-617. 1987.

Van Dijck, R.; Proft, M. de; Greef, J. de: Role of ethylene and cytokinins in the initiation of lateral shoot growth in bromeliads. **Plant Physiology** 86: 836-840. 1988.

Zornig, R. K.: Micropropagação de bromélias. **Bromélia** 3: 3-8. 1996.

CAPÍTULO II

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Acanthostachys strobilacea* (Schultes f.) Klotzsch

Resumo

O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo para propagação *in vitro* de *Acanthostachys strobilacea*. Na etapa de multiplicação testou-se o efeito de 0, 10, 20, 40 e 80 μM de BAP e duas concentrações dos sais minerais de Murashige e Skoog (1962) (50 e 100%), com 100% de nutrientes orgânicos. Na etapa de aclimatização as plântulas de *A. strobilacea*, sem raízes, foram separadas em três grupos: 1 (10 a 20 mm), 2 (30 a 40 mm) e 3 (50 a 60 mm). Como substrato testou-se xaxim e aguapé. Observou-se que o número de brotações formadas foi maior na concentração estimada de 26,8 μM BAP (60,7 brotações por plântula). No entanto, a altura média das brotações diminuiu com o aumento da concentração de BAP. Na ausência de BAP foi observado a formação de raízes, sendo que na presença de BAP a formação de raízes foi inibida. Não houve diferença significativa para as características avaliadas, entre as duas concentrações do meio MS. Foi possível aclimatizar plântulas de *A. strobilacea* com altura a partir de 10 mm e sem raízes. O aguapé demonstrou ser um bom substrato para aclimatização desta espécie, com percentagem de sobrevivência superior a 85%.

2.1. Introdução

Dentre as bromeliáceas ornamentais, *Acanthostachys strobilacea* (Schultes f.) Klotzsch se caracteriza por apresentar folhas fasciculadas ao longo do caule sem formar roseta nem cisterna, inflorescência colorida com flores agrupadas, assemelhando-se a um estróbilo e bagas grandes, de coloração laranja a vermelho intenso (Reitz, 1983).

A. strobilacea é, preferencialmente, epífita e raramente rupícola ou saxícola. Esta espécie apresenta grande distribuição no Brasil. Na Zona da Mata de Minas Gerais, ocorre exclusivamente como epífita em grandes árvores, desenvolvendo-se, geralmente, em bifurcações de troncos. O extrativismo destas grandes árvores levou a uma redução drástica na população desta espécie, sendo hoje encontrada quase que somente nos fragmentos florestais ainda existentes naquele estado. A baixa produção de sementes, com dispersão restrita pelas aves, dificulta o seu restabelecimento natural nos remanescentes florestais. A propagação vegetativa é pouco eficiente. Após a floração, a planta produz de dois a três brotos, por ano, que surgem na base da mesma (Paula, 2003).

Dessa forma, o estabelecimento de um protocolo para propagação *in vitro* desta espécie é a maneira mais eficiente de disponibilizar mudas para futuras reintroduções ou mesmo para o cultivo comercial, sendo este protocolo o objetivo deste trabalho.

2.2. Material e métodos

O cultivo *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e a etapa de aclimatização foi realizada na Unidade de Pesquisa e Conservação de Bromeliaceae (UPCB), do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

2.2.1. Estabelecimento *in vitro*

As sementes de *Acanthostachys strobilacea* (Schultes f.) Klotzsch¹, obtidas de espécimes cultivados na UPCB, foram desinfestadas através da imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto, lavadas com água deionizada estéril e em seguida imersas em solução de hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo) e 0,01% de Tween 20, por 15 minutos. Em todas as etapas, as sementes foram mantidas sob agitação. Após o tratamento de desinfestação, as sementes foram enxaguadas, por três vezes, com água deionizada estéril. Em seguida foram inoculadas em meio de cultivo. Este foi composto dos 50% de sais minerais e 100% de compostos orgânicos do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962). O pH do meio foi ajustado para $5,70 \pm 0,01$ e gelificado com $8,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Grupo Química). Utilizou-se 10 mL de meio em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) que foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após inoculação, os explantes foram incubados à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram[®], luz do dia, 40 W).

2.2.2. Multiplicação *in vitro*

Na fase de multiplicação *in vitro*, foram testadas cinco concentrações de BAP (0, 10, 20, 40 e $80 \mu\text{M}$) e duas concentrações dos sais de MS (50% e 100%), em um experimento fatorial (5 x 2). O delineamento adotado foi o de blocos completos casualizados (DBC), com seis repetições. Cada bloco foi constituído de plântulas previamente estabelecidas *in vitro*, de tamanho uniforme (mínimo de 20 mm) e sem raízes. Todos os meios de cultivo continham os componentes orgânicos completos do meio MS e o pH ajustado para $5,70 \pm 0,01$, antes da esterilização à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados recipientes de 350 mL, contendo 15 mL de meio de cultura, onde foi colocada uma plântula. O cultivo foi conduzido em meio líquido estacionário, nas condições ambientais mencionadas anteriormente, por um

¹ A identificação do material para o recente trabalho fundamentou-se na análise da morfologia vegetativa e floral de espécimes cultivadas na Unidade de Pesquisas e Conservação de Bromeliaceae (UPCB) - UFV, bem como na análise de exsicata (VIC nº 26.461), no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal (Herbário VIC).

período de sete semanas, quando foram submetidos à avaliação. As características observadas foram o número de brotações por plântula, a altura média das brotações e a presença de raízes nas brotações.

2.2.3. Alongamento e enraizamento *in vitro*

A etapa de alongamento e enraizamento foi conduzida no mesmo tipo de recipiente da fase anterior, contendo 15 mL de meio líquido, em condição estacionária. O meio de cultivo foi composto de 50% de sais e 100% de compostos orgânicos de MS. O pH do meio, a esterilização e as condições de incubação foram como as descritas nas etapas anteriores.

2.2.4. Aclimatização

A etapa de aclimatização foi realizada no período de abril a junho de 2003. Foram selecionadas plântulas de *A. strobilacea*, removidas as raízes, e separadas em três grupos: 1 (10 a 20 mm), 2 (30 a 40 mm) e 3 (50 a 60 mm). Estas foram plantadas em bandejas de isopor com células de 50 mL. Testou-se xaxim (*Dicksonia sellowiana* (Pr.) Hook) e aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) seco e desfiado a mão, proveniente da lagoa do Setor de Equideocultura da UFV. O experimento foi montado em um fatorial 3 x 2, em DBC, com cinco repetições e 12 plântulas por parcela. Quinze dias após o plantio, as plântulas foram pulverizadas com benlate (2 g L^{-1}). Aos 29 dias foram adubadas com Osmocote® 14-14-14 (0,03 g por célula) e passaram a receber adubação foliar semanalmente (2 g L^{-1} Peters® 20-20-20). Aos 60 dias foram avaliadas a percentagem de sobrevivência, o número de raízes por planta e a matéria seca por planta.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias das características ajustadas à regressão ou comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Estabelecimento *in vitro*

O tratamento de desinfestação das sementes proporcionou uma percentagem de contaminação menor que 1%. A germinação das sementes ocorreu com aproximadamente 15 dias da incubação. O tempo de exposição e a concentração das soluções desinfestantes não prejudicaram a viabilidade das sementes, que possuíam um tegumento rígido, característica das espécies da subfamília Bromelioideae (Smith e Daws, 1979). Esta metodologia também foi eficiente na desinfestação de sementes de *Aechmea bambusoides* (Capítulo III) e *Quesnelia quesneliana* (Capítulo IV). Quando as sementes estão protegidas por seus tecidos tegumentares, a concentração e o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio podem ser maiores (Grattapaglia e Machado, 1998). Para a assepsia de gemas de *Neoregelia carolinae*, Tombolato et al. (1998) recomendaram usar hipoclorito de cálcio a 1,5%, por 10 minutos.

A localização do explante na planta e o ambiente em que as plantas matrizes foram mantidas e seu bom aspecto fitossanitário podem ter contribuído também para a baixa percentagem de contaminação. Além disso as sementes utilizadas neste experimento foram extraídas de frutos intactos, nos quais as sementes se encontravam protegidas por uma mucilagem.

2.3.2. Multiplicação *in vitro*

O número de brotações formadas foi maior na concentração estimada de 26,8 μM de BAP (60,7 brotações por plântula). Em concentrações superiores a esta, o BAP mostrou-se inibitório ao processo de brotação (Figura 1A). O efeito antagônico de dosagens elevadas de BAP também tem sido observado na brotação de gemas de abacaxi (*Ananas comosus*) (Kiss et al., 1995).

A altura média das brotações diminuiu com o aumento da concentração de BAP (Figura 1B). Provavelmente, a adição crescente de BAP ao meio de cultivo diminuiu a relação auxina/citocinina das plântulas *in vitro*, inibindo o alongamento das brotações (Taiz e Zeiger, 2002). Outros fatores, como competição por nutrientes e espaço, também podem ter afetado a altura das brotações.

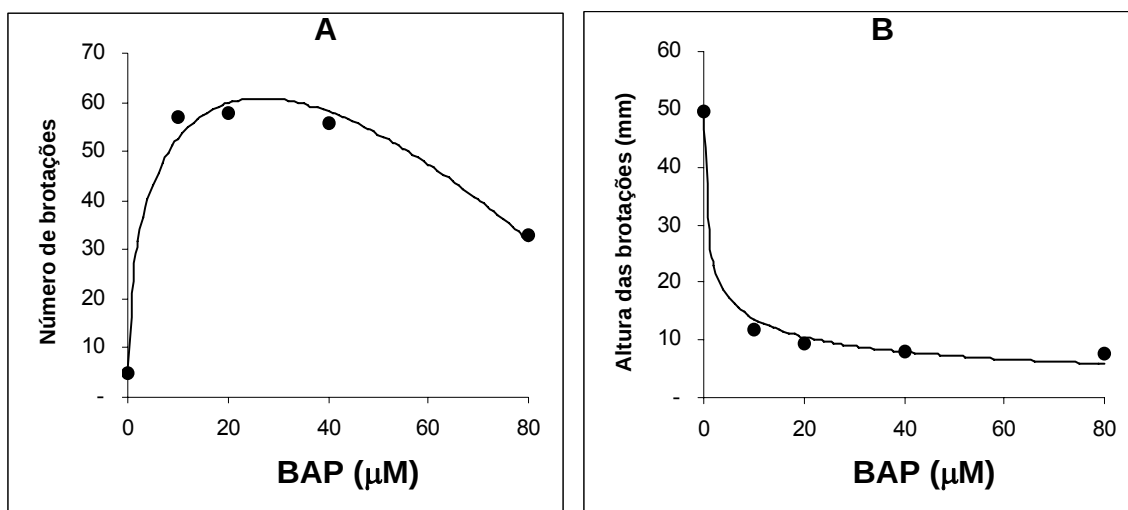


Figura 1: Estimativa do efeito do BAP no número de brotações (A) e na altura média das brotações (B) de *Acanthostachys strobilacea*. (A: $\hat{Y} = 5,974456 - 2,0416547^{**}X + 21,15971^{**}X^{0,5}$, $R^2 = 0,94$; B: $\hat{Y}^{-1} = 0,020238126^{**} + 0,016773467^{**}X^{0,5}$, $R^2 = 0,99$).

Na ausência de BAP observou-se a formação de raízes, sendo que na presença deste fitoregulador a formação de raízes foi inibida (dados não apresentados). O efeito inibitório do BAP na formação de raízes *in vitro* é bastante conhecido, sendo atribuído à baixa relação auxina/citocinina (Fosket, 1994).

Neste experimento não se observou efeito significativo das diferentes concentrações do meio MS, para as características avaliadas, indicando que a metade da concentração dos sais do MS é suficiente para permitir bom desenvolvimento das brotações (Figuras 2).

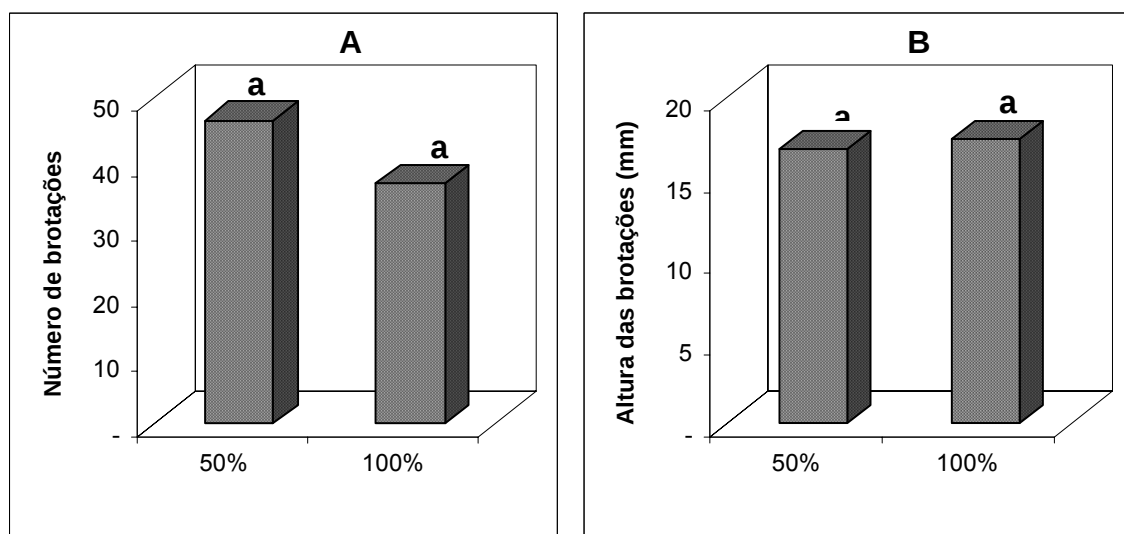


Figura 2: Efeito da concentração de sais de MS no número de brotações (A) e na altura das brotações (B) de *Acanthostachys strobilacea*. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,05$).

2.3.3. Alongamento e enraizamento *in vitro*

Após sete semanas de incubação, observou-se que o processo de alongamento e de enraizamento das brotações não era sincronizado. O surgimento de novas brotações era comum durante esta fase do cultivo, o que, provavelmente, deve estar relacionado ao efeito residual do BAP. A falta de sincronização pode ter ocorrido também devido à grande variabilidade genética das plântulas empregadas neste trabalho, uma vez que estas foram obtidas de sementes. Uma prática comum na produção de mudas *in vitro* é a separação e a seleção de brotações de tamanho adequado para a aclimatização, recultivando-se as demais até atingirem o tamanho requerido.

2.3.4. Aclimatização

Na aclimatização obteve-se maior percentagem de sobrevivência quando as mudas foram aclimatizadas no xaxim (Figura 3A). Para o número de raízes por planta, quando as mudas foram aclimatizadas em xaxim, este também foi significativamente superior ao aguapé (Figura 4A). Já para matéria seca não houve diferença entre os dois substratos (Figura 5A).

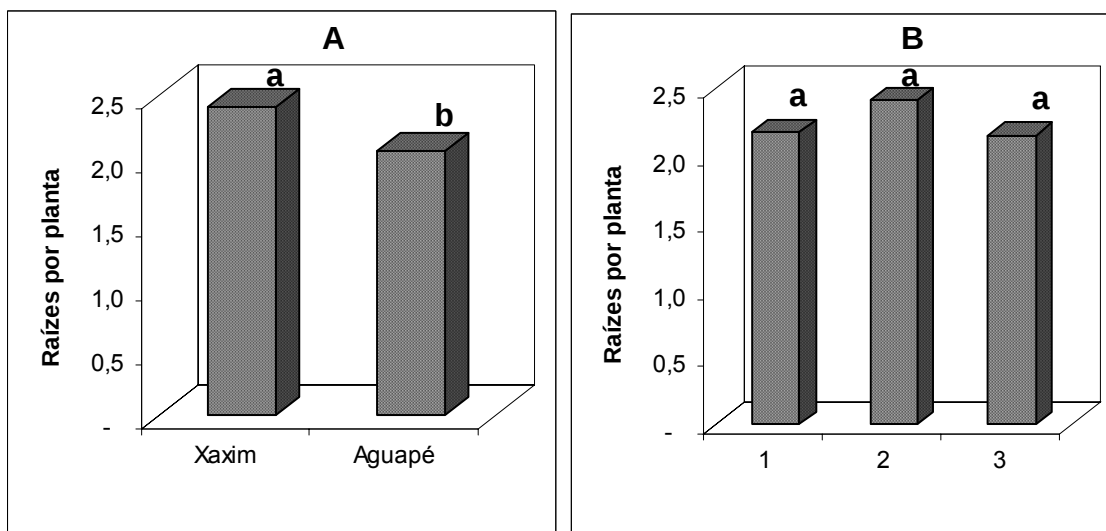


Figura 3: Efeito do substrato (A) e da altura das plântulas (B) (1= 10 a 20 mm, 2= 30 a 40 mm e 3= 50 a 60 mm) na percentagem de sobrevivência de plântulas de *Acanthostachys strobilacea*. Médias seguidas por letra diferente diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,01$; A) e teste de Tukey ($P \leq 0,05$; B).

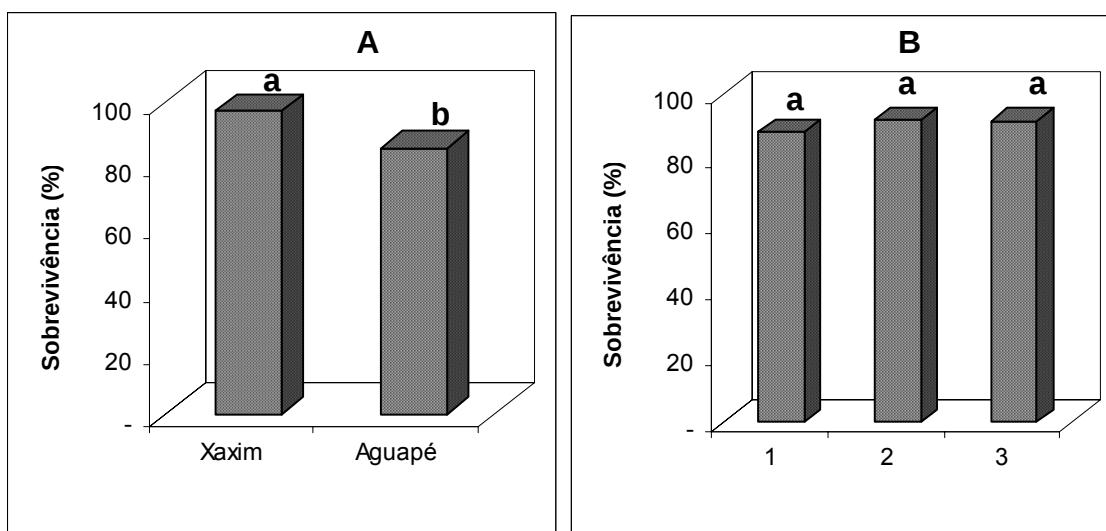


Figura 4: Efeito do substrato (A) e da altura das plântulas (B) (1= 10 a 20 mm, 2= 30 a 40 mm e 3= 50 a 60 mm) no número de raízes emitidas por planta, durante a aclimatização de plantas de *Acanthostachys strobilacea*. Médias seguidas por letra diferente, diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,05$; A) e teste de Tukey ($P \leq 0,05$; B).

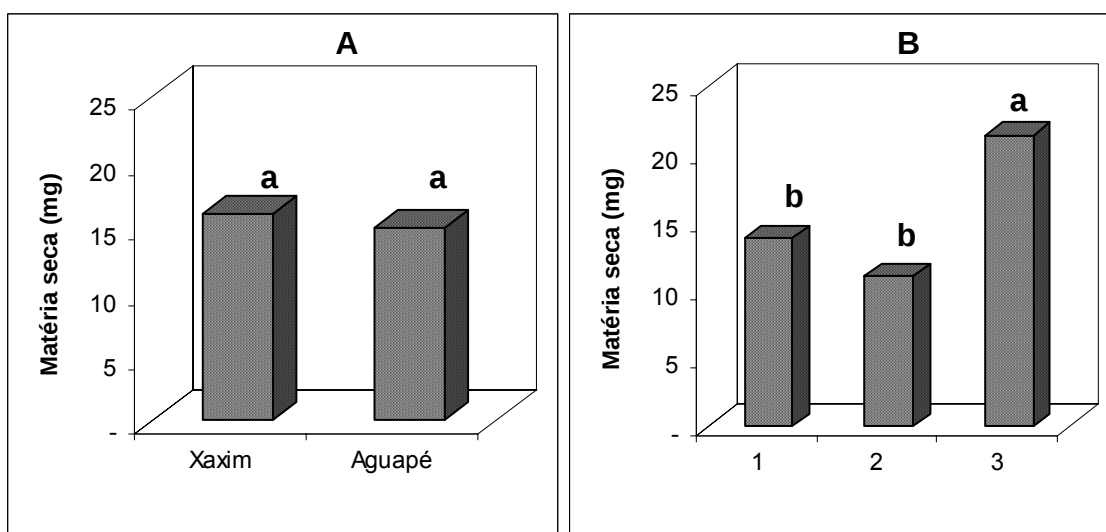


Figura 5: Efeito do substrato (A) e da altura das plântulas (B) (1= 10 a 20 mm, 2= 30 a 40 mm e 3= 50 a 60 mm) na matéria seca por planta de *Acanthostachys strobilacea*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,05$; A) e teste de Tukey ($P \leq 0,05$; B).

Apesar de a percentagem de sobrevivência e o número de raízes emitidas por planta terem sido estatisticamente superior no xaxim, o aguapé demonstrou ser um bom substrato para aclimatização desta espécie, uma vez que a percentagem de sobrevivência foi superior a 85%. Contudo, há a necessidade de se estudar melhor a forma de preparação deste substrato, incluindo a sua esterilização e a mistura com outros componentes, o que

poderia aumentar a performance do aguapé como substrato de aclimatização de mudas produzidas *in vitro* de *A. strobilacea*.

As plântulas do grupo 3, como já era esperado por ter altura inicial maior, apresentaram maior matéria seca do que as dos grupos 1 e 2 (Figura 5B), entretanto, a altura inicial das plântulas não influenciou a formação de raízes (Figura 4B), nem a taxa de sobrevivência (Figura 3B). Desta forma, é possível aclimatizar plântulas de *A. strobilacea* com altura a partir de 10 mm e sem raízes. Estes resultados contrastam com os estudos de Zornig (1996) e Costa (1998) nos quais afirmam que, para a aclimatização, as plântulas devem apresentar sistema radicular e parte aérea proporcionais a fim de garantir maior taxa de sobrevivência. Entretanto, devido a dificuldade de manuseio das plântulas com menor altura, deve-se avaliar economicamente os custos de manutenção em laboratório e de mão-de-obra capacitada para a aclimatização. Neste processo, plântulas com menor altura exigem maior habilidade no manuseio.

2.4. Conclusões

O número de plântulas formadas foi maior na concentração estimada de 26,8 μ M BAP (60,7 brotações por plântula). No entanto, a altura média das brotações diminuiu com o aumento da concentração de BAP.

Na ausência de BAP, observou-se a formação de raízes, sendo que na presença de BAP a formação de raízes foi inibida.

Não houve diferença significativa para as características avaliadas, entre as duas concentrações do meio MS.

Na aclimatização, foi possível aclimatizar plântulas de *A. strobilacea* com altura a partir de 10 mm e sem raízes.

O aguapé demonstrou ser um bom substrato para aclimatização desta espécie, com percentagem de sobrevivência superior a 85%.

2.5. Protocolo

2.5.1. Estabelecimento

O estabelecimento *in vitro* de espécimes de *A. strobilacea* pode ser feito a partir de sementes obtidas de frutos maduros. As sementes devem ser desinfestadas em álcool 70% (v/v) por um minuto; lavadas com água deionizada estéril e tratadas em hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo) + 0,01% de Tween 20 por 15 minutos. Após o tratamento, lavar por três vezes com água deionizada estéril sempre sob agitação. A inoculação das sementes deve ser feita em meio de cultivo gelificado, contendo o meio MS modificado (50% de sais minerais e 100% de compostos orgânicos) (Murashige e Skoog, 1962).

O pH do meio de cultivo deve ser ajustado para $5,70 \pm 0,01$ e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

O ambiente de incubação deve apresentar temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes (luz do dia, 40 W).

2.5.2. Multiplicação

Quando as plântulas atingirem tamanho mínimo de 20 mm, transferir para o meio de cultivo líquido, contendo 50% dos sais minerais de MS e 26,8 μM de BAP, por um período de sete semanas.

O pH do meio de cultivo, a autoclavagem e o ambiente de incubação devem ser como descritos na etapa de estabelecimento.

2.5.3. Alongamento e enraizamento

Após o período de incubação em meio de multiplicação, transferir as brotações, sem dividi-las, para o meio contendo MS modificado, na forma líquida.

O pH do meio de cultivo, a autoclavagem e o ambiente de incubação devem ser como descritos na etapa de estabelecimento.

2.5.4. Aclimatização

Considerando-se a facilidade de manuseio, quando as brotações atingirem 30 a 40 mm de altura, separá-las e plantá-las em bandejas coletivas contendo aguapé seco e desfiado, sob condições de telado (50% de sombra). A irrigação deve ser feita para manter o substrato úmido, porém nunca encharcado. Recomenda-se aplicar adubação foliar a intervalos semanais, com a formulação de 20-20-20 (N P K), na proporção de 2 g L⁻¹.

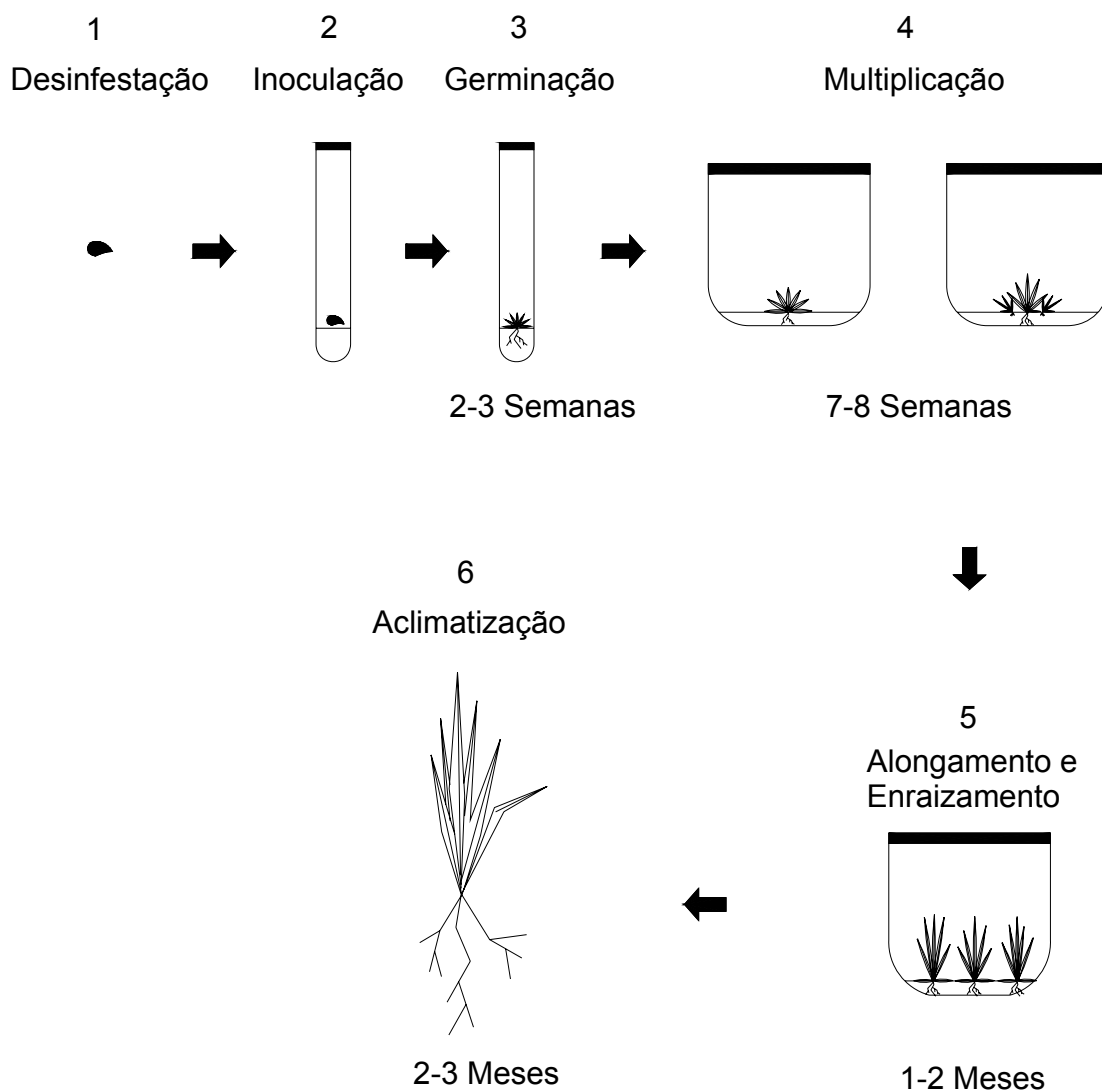


Figura 6: Esquema ilustrativo do protocolo para propagação *in vitro* de *Acanthostachys strobilaceae*.

Referências

- Costa, A. M. M.: **Fisiologia da aclimação**. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) Micropropagação de plantas ornamentais, p. 63-67. Instituto Agrônomo, Campinas. 1998.
- Fosket, D. E.: **Plant growth and development: a molecular approach**. Academic Press, San Diego. 1994.
- Grattapaglia, D.; Machado, M. A.: **Micropropagação**. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (eds) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, p. 183-260. Embrapa, Brasília. 1998.
- Paula, C. C. de. **Comunicação pessoal**. Departamento de biologia vegetal – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2003.
- Kiss, E.; Kiss, J.; Gyulai, G.; Heszky, L. E.: A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience** 30: 127-129. 1995.
- Murashige, T.; Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497. 1962.
- Reitz, R.: **Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica**. Herbário "Barbosa Rodrigues", Itajaí. 808p. 1983.
- Smith, L. B.; Downs, R. J.: **Flora Neotropica**. Bromelioideae (Bromeliaceae). The New York Botanical Garden, Nova Iorque. 1491-2142p. 1979.
- Taiz, L.; Zeiger, E.: **Plant Physiology**. Sinauer Associates, Sunderland. 690p. 2002.
- Tombolato, A. F. C.; Takebayashi, S. S. G.; Costa, A. M. M.; Quirino, E. A.: **Bromélia (*Neoregelia carolinae*)**. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) Micropropagação de plantas ornamentais, p. 22-24. Instituto Agrônomo, Campinas. 1998.
- Zornig, R. K.: Micropropagação de bromélias. **Bromélia** 3: 3-8. 1996.

CAPÍTULO III

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Aechmea bambusoides* L. B. Smith & Reitz

Resumo

No presente trabalho definiu-se um protocolo para a propagação *in vitro* de *Aechmea bambusoides*. Testou-se BAP nas concentrações de 0, 10, 20, 40 e 80 μM e duas concentrações dos sais minerais de MS (50 e 100%), na etapa de multiplicação. Na aclimatização, as plântulas de *A. bambusoides*, sem raízes, foram separadas em dois grupos: 1 (plântulas de 20 a 40 mm) e 2 (plântulas de 41 a 60 mm). Estimou-se que a concentração de 26,11 μM foi a mais eficiente para multiplicação, promovendo em média 18,39 brotações. A concentração de 100% de sais de MS propiciou maior número de brotações. Na ausência de BAP, a altura das brotações foi maior no meio MS com 100% da concentração de sais. Não houve formação de raízes nos meios que continham BAP. É possível aclimatizar plântulas de *A. bambusoides* com altura a partir de 40 mm e sem raízes. O aguapé pode ser utilizado como substrato alternativo para o xaxim, na aclimatização desta espécie.

3.1. Introdução

O gênero *Aechmea* Ruiz & Pavon, pertencente a subfamília Bromelioideae, é o maior da família Bromeliaceae, com 231 espécies e 55 variedades (Luther, 2000). Por possuírem formas esculturais, são muito utilizadas em projetos paisagísticos (Melo, 1996).

Aechmea bambusoides L. B. Smith & Reitz, apesar de não ser cultivada com fins comerciais, apresenta grande potencial ornamental, devido a arquitetura de suas folhas e Inflorescência multicolorida (Paula, 2003). É uma espécie endêmica da Mata Atlântica e, em Minas Gerais, está ameaçada de extinção (Mendonça e Lins, 2000).

Na Universidade Federal de Viçosa estuda-se a conservação desta espécie *in vitro*. De acordo com Bajaj (1995), isto implica na redução dos custos associados à manutenção de coleções e à minimização de perdas causadas por doenças e contaminações.

Entretanto, para se utilizar o cultivo *in vitro* é necessário o desenvolvimento de protocolos, que variam em função da espécie (Tombolato et al. 1998). As concentrações dos reguladores de crescimento, por exemplo, são específicas para cada espécie, nas diferentes etapas de cultivo (Tagliacozzo, 1998), podendo variar dentro da própria espécie (Almeida et al., 1997).

Considerando-se que o cultivo *in vitro* ainda não é praticado para a conservação de *A. bambusoides*, objetivou-se nesse trabalho definir um protocolo para a propagação *in vitro* desta espécie.

3.2. Material e métodos

O cultivo *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e a etapa de aclimatização foi realizada na Unidade de Pesquisa e Conservação de Bromeliaceae (UPCB), do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

3.2.1. Estabelecimento *in vitro*

As sementes de *Aechmea bambusoides* L. B. Smith & Reitz² obtidas de espécimes cultivadas no UPCB, foram desinfestadas através da imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto, lavadas com água deionizada estéril e, em seguida, imersas em solução de hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo) e 0,01% de Tween 20, por 15 minutos. Em todas as etapas, as sementes foram mantidas sob agitação. Após o tratamento de desinfestação, as sementes foram enxaguadas por três vezes com água deionizada estéril. Em seguida, foram inoculadas em meio de cultivo. Este foi composto de 50% dos sais minerais e 100% de compostos orgânicos do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962). O pH do meio foi ajustado para $5,70 \pm 0,01$ e gelificado com $8,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Grupo Química). Utilizou-se 10 mL de meio em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) que foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos. Após inoculação, os explantes foram incubados à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram[®], luz do dia, 40 W).

3.2.2. Multiplicação *in vitro*

Na fase de multiplicação *in vitro*, foram testadas cinco concentrações de BAP (0, 10, 20, 40 e $80 \mu\text{M}$) e duas concentrações dos sais minerais de MS (50% e 100%), em um experimento fatorial (5×2). O delineamento adotado foi o de blocos completos casualizados (DBC), com seis repetições. Cada bloco foi constituído de plântulas previamente estabelecidas *in vitro*, de tamanho uniforme (mínimo de 15 mm) e sem raízes. Todos os meios de cultivo continham os componentes orgânicos completos do meio MS e o pH ajustado para $5,70 \pm 0,01$, antes da esterilização a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados recipientes de 350 mL, contendo 15 mL de meio de cultura, onde foi colocada uma plântula. O cultivo foi conduzido em meio líquido estacionário, nas condições de incubação mencionadas anteriormente, por um

² A identificação do material para o recente trabalho fundamentou-se na análise da morfologia vegetativa e floral de espécimes cultivadas na Unidade de Pesquisas e Conservação de Bromeliaceae (UPCB) - UFV, bem como na análise de exsicata (VIC nº 15.141), no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal (Herbário VIC).

período de sete semanas, quando as plântulas foram submetidas à avaliação. As características observadas foram o número de brotações formadas, a altura média das brotações e a presença de raízes nas plântulas.

3.2.3. Alongamento e enraizamento *in vitro*

A etapa de alongamento e enraizamento foi conduzida no mesmo tipo de recipiente da fase anterior, contendo 15 mL de meio líquido, em condição estacionária. O meio de cultivo foi composto de 50% de sais e 100% dos compostos orgânicos de MS. O pH do meio, a esterilização e as condições de incubação foram como as descritas nas etapas anteriores.

3.2.4. Aclimatização

A etapa de aclimatização foi realizada no período de abril a junho de 2003. Foram selecionadas plântulas de *A. bambusoides*, separadas em dois grupos: 1 (plântulas de 20 até 40 mm) e 2 (plântulas acima de 41 até 60 mm). As plântulas tiveram as raízes removidas, para avaliar a capacidade de enraizamento. Estas foram plantadas em bandejas de isopor com células de 50 mL. Como substrato, testou-se xaxim (*Dicksonia sellowiana* (Pr.) Hook) e aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) seco e desfiado a mão, proveniente da lagoa do Setor de Equideocultura da UFV. O experimento foi montado em esquema fatorial 2 x 2, em DBC, com 5 repetições e 12 plântulas por parcela. Nove dias após o plantio, as plântulas foram pulverizadas com benlate (2 g L⁻¹). Aos 30 dias foram adubadas com Osmocote® 14-14-14 (0,03 g por célula) e passaram a receber adubação foliar, semanalmente (2 g L⁻¹ Peters® 20-20-20). Aos 60 dias foram avaliadas percentagens de sobrevivência, o número de raízes por planta e a matéria seca por planta.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias das características ajustadas à regressão.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Estabelecimento *in vitro*

O tratamento de desinfestação das sementes proporcionou uma percentagem de contaminação menor que 1%. A germinação das sementes ocorreu com aproximadamente 20 dias da incubação. O tempo de exposição e a concentração das soluções desinfestantes não prejudicaram a viabilidade das sementes, que possuíam um tegumento rígido. Quando as sementes estão protegidas por seus tecidos tegumentares, a concentração e o tempo de exposição, ao hipoclorito de sódio podem ser maiores (Grattapaglia e Machado, 1998). Para a assepsia de gemas de *Neoregelia carolinae*, Tombolato et al. (1998) recomendaram usar hipoclorito de cálcio a 1,5%, por 10 minutos.

A localização do explante na planta e o ambiente em que as plantas matrizes foram mantidas e seu bom aspecto fitossanitário podem ter contribuído, também, para a baixa percentagem de contaminação. Além disso as sementes utilizadas neste experimento foram extraídas de frutos intactos, nos quais as sementes se encontravam protegidas por uma mucilagem.

3.3.2. Multiplicação *in vitro*

Estimou-se que a concentração de 26,11 μM de BAP foi a mais eficiente para multiplicação, promovendo em média 18,39 brotações por plântula (Figura 1A). A partir desta concentração houve diminuição no número de brotações, o que de acordo com Leshen et al. (1988), altas concentração de BAP podem ter efeito fitotóxico para o vegetal. A inibição do número de brotações em altas concentração de BAP também foi verificada em abacaxi (*Ananas comosus*) (Kiss et al., 1995). A concentração de 100% de sais minerais de MS foi significativamente superior, na indução de brotações, à metade da concentração de sais de MS (Figura 2A).

Para a altura média das brotações, houve interação entre as concentrações de sais de MS e BAP, sendo que as brotações obtidas na ausência de BAP, foram 7,9 mm maiores no meio MS, com 100% das concentrações de sais (Figura 2B). Estes resultados indicam que a

concentração de sais na etapa de multiplicação pode variar entre as espécies de bromélias. As espécies *Acanthostachys strobilacea* (Capítulo II) e *Quesnelia quesneliana* (Capítulo IV), por exemplo, são menos exigentes quanto a concentração de sais no meio durante a fase de multiplicação.

O efeito do BAP foi inibitório quanto ao alongamento das brotações durante a fase de multiplicação (Figura 1B). A concentração de 100% de sais de MS foi significativamente superior para a altura das brotações na ausência de BAP, porém, esta diferença não foi observada em tratamentos que continham BAP (Figura 2B).

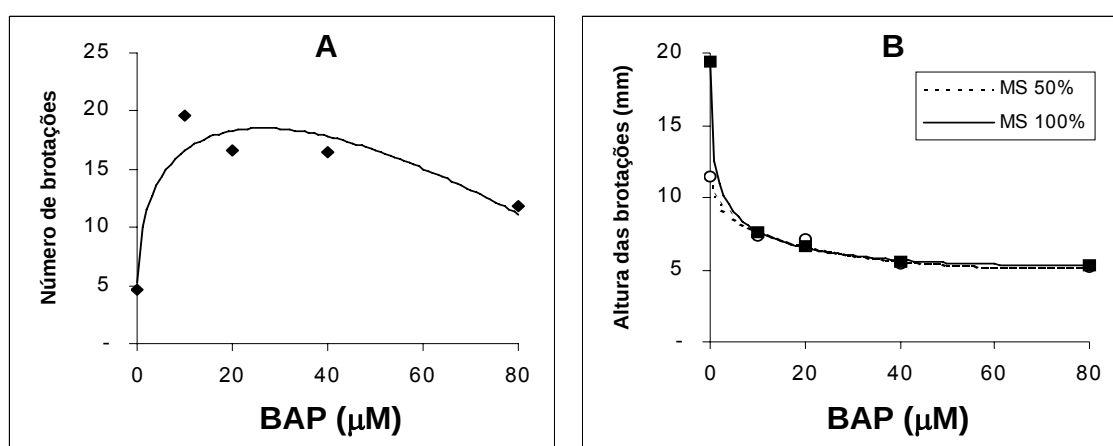


Figura 1: Estimativa do efeito do BAP no número de brotações (A) e na altura média das brotações (B) de *Aechmea bambusoides*. [A: $\hat{Y} = 5,29437786 - 0,50527423X + 5,1725973 \cdot X^{0,5}$, $R^2 = 0,58$; B: MS 50%: $\hat{Y} = 11,418644^{**} + 0,082305754X - 1,4396648 \cdot X^{0,5}$, $R^2 = 0,93$; MS 100% $\hat{Y} = 1/(0,051428043^{**} - 0,0016670239^{**}X + 0,030319132^{**}X^{0,5})$, $R^2 = 0,99$].

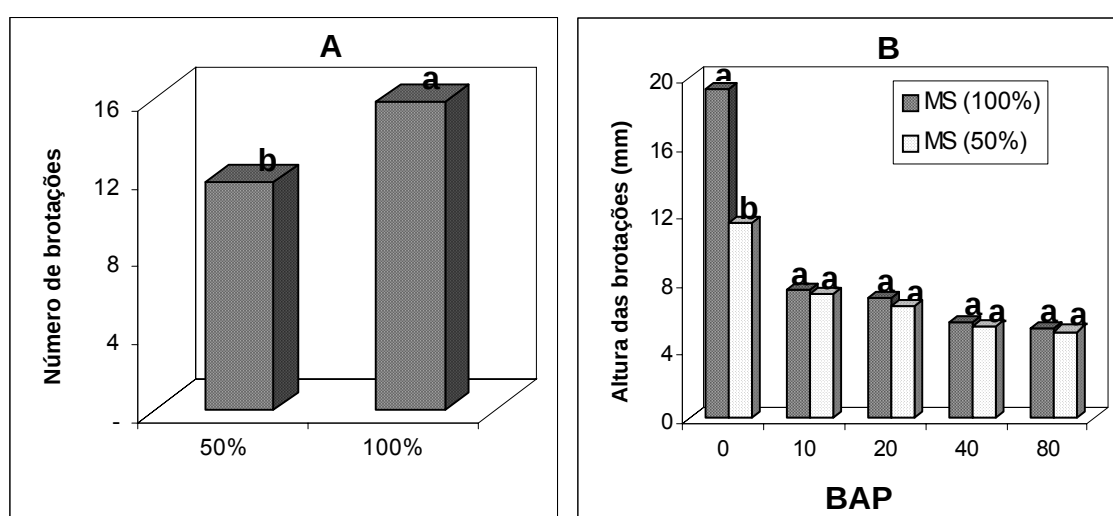


Figura 2: Efeito da concentração de sais de MS no número de brotações (A) e na altura das brotações (B) de *Aechmea bambusoides*. Médias seguidas por letra diferente (A) e por letra diferente dentro de cada concentração de BAP (B), diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,05$, A; $P \leq 0,01$, B).

Não se observou a formação de raízes nos tratamentos contendo BAP (dados não apresentados). A presença de BAP no meio de cultivo também inibiu a formação de raízes em *A. strobilacea* (Capítulo II) e *Q. quesneliana* (Capítulo IV). Desta forma, o BAP adicionado ao meio de cultivo, ao alterar o balanço entre as citocininas e auxinas, pode ter inibido o alongamento das brotações e a formação de raízes.

3.3.3. Alongamento e enraizamento *in vitro*

Após sete semanas de incubação, observou-se que o processo de alongamento e de enraizamento das brotações não eram sincronizados. O surgimento de novas brotações era comum durante esta fase do cultivo, o que, provavelmente, deve estar relacionado ao efeito residual do BAP. A falta de sincronização pode ter ocorrido também devido a grande variabilidade genética das plântulas empregadas neste trabalho, uma vez que estas foram obtidas de sementes. Uma prática comum na produção de mudas *in vitro* é a separação e a seleção de brotações de tamanho adequado para a aclimatização, recultivando-se as demais até atingir o tamanho requerido.

3.3.4. Aclimatização

Na aclimatização o número de raízes produzidas por planta no xaxim foi significativamente superior ao aguapé (Figura 3A). Isto deve ter ocorrido devido à maior porosidade do xaxim em relação ao aguapé, que deve ter permitido maior drenagem e aeração. De acordo com Paula e Silva (2001), estas características permitem o bom desenvolvimento das raízes. Apesar das plantas aclimatizadas em aguapé terem apresentado menor número de raízes, a matéria seca e a taxa de sobrevivência não foram afetadas estatisticamente entre os substratos (Figuras 4A e 5A). Provavelmente, isto ocorreu devido à presença de tricomas nas folhas das bromélias, que, além das raízes, absorvem água e nutrientes (Smith e Downs, 1974), uma vez que todas as plantas receberam adubação foliar. Estes resultados indicam ser possível a aclimatização de *A. bambusoides* em aguapé, que pode ser considerado uma

alternativa para substituir o xaxim, que está ameaçado de extinção (IBAMA, 1992).

Como esperado, a matéria seca das plantas do grupo 1, com altura inicial maior, foi significativamente inferior às do grupo 2 (Figura 4B), uma vez que plantas do grupo 2 eram, inicialmente, mais altas do que às do grupo 1. Porém, isto não teve influência negativa no desenvolvimento das plantas de *A. bambusoides*, visto que o número de raízes por planta e a percentagem de sobrevivência não foram afetados pelo seu tamanho inicial (Figuras 3B e 5B). Dessa forma, plântulas com 40 mm de altura e sem raízes podem ser aclimatizadas, o que torna possível reduzir o tempo de manutenção em laboratório. Estes resultados indicam que a etapa de enraizamento *in vitro*, deve ser melhor estudada e comparada com o comportamento dessas plântulas na aclimatização, pois plântulas de *A. bambusoides* desenvolveram raízes adventícias quando transferidas para o ambiente *ex vitro*.

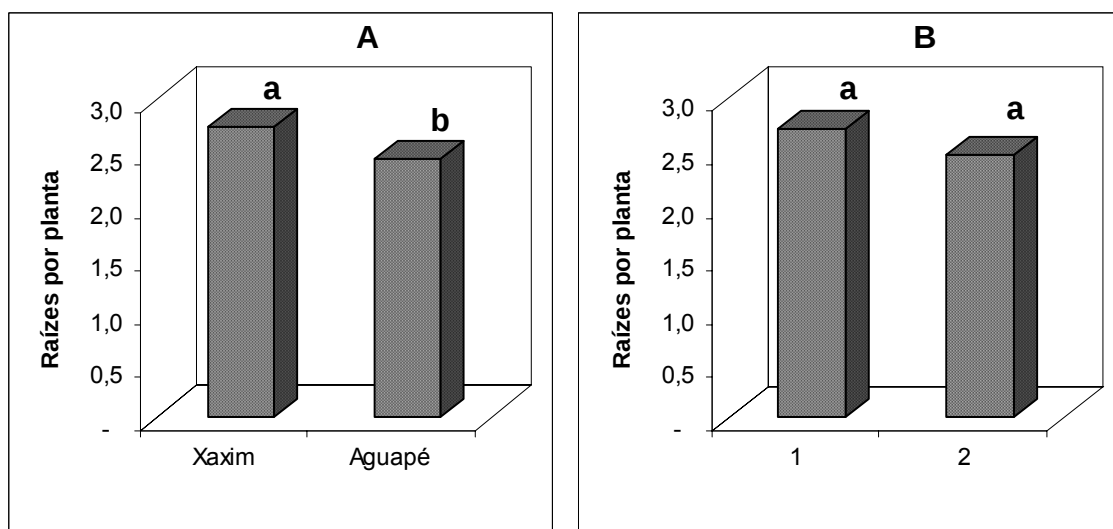


Figura 3: Efeito do substrato (A) e da altura das plântulas (B) (1= 20 a 40 mm e 2= 40 a 60 mm) no número de raízes emitidas por planta, durante a aclimatização de *Aechmeia bambusoides*. Médias seguidas por letra diferente, diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,05$).

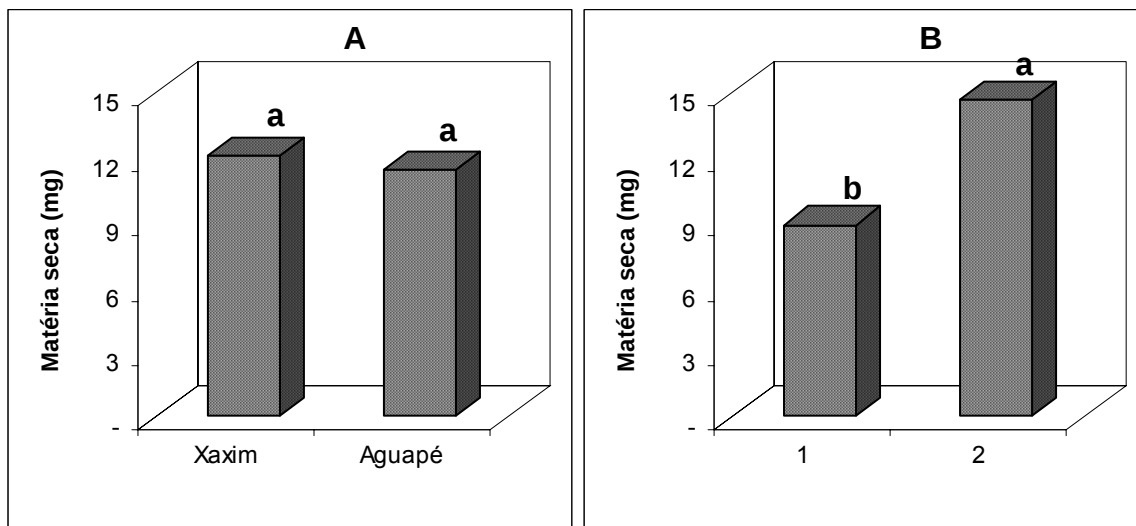


Figura 4: Efeito do substrato (A) e da altura das plântulas (B) (1= 20 a 40 mm e 2= 40 a 60 mm) na matéria seca por planta de *Aechmeia bambusoides*. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,05$; A e $P \leq 0,01$; B).

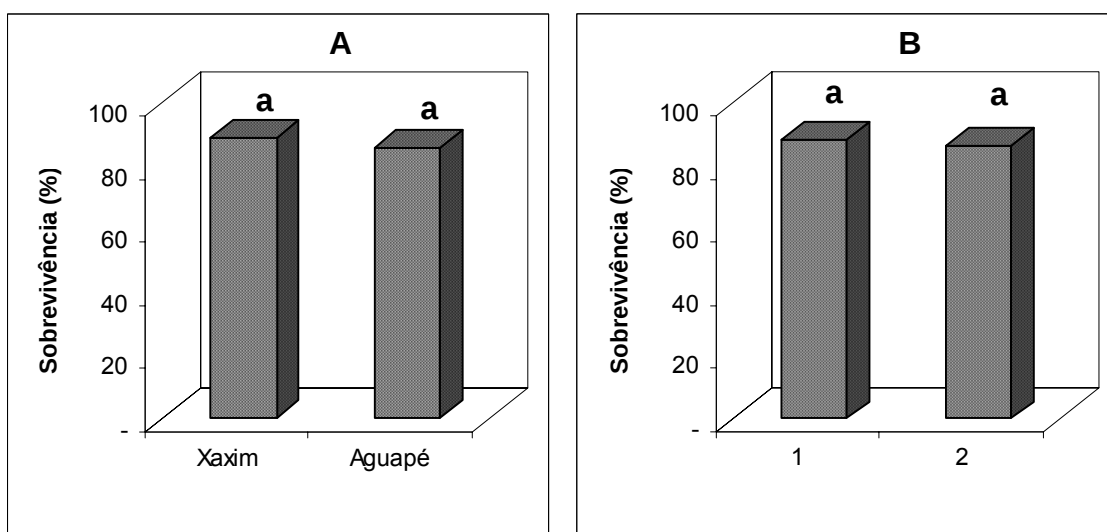


Figura 5: Efeito do substrato (A) e da altura das plântulas (B) na percentagem de sobrevivência de *Aechmeia bambusoides*. Médias seguidas por letra diferente, diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,05$).

3.4. Conclusões

A concentração estimada de 26,11 μM de BAP foi a mais eficiente para estimular as brotações, promovendo em média 18,39 brotações por plântula.

A presença deste regulador de crescimento no meio de cultura, inibiu o alongamento e a emissão de raízes das brotações.

A concentração de 100% de sais de MS propiciou maior número de brotações. Na ausência de BAP, a altura das brotações foi maior no meio MS com 100% da concentração de sais.

Não houve formação de raízes nos meios que continham BAP. É possível aclimatizar plântulas de *A. bambusoides* com altura a partir de 40 mm e sem raízes.

O aguapé pode ser utilizado como substrato alternativo para o xaxim, na aclimatização desta espécie.

3.5. Protocolo

3.5.1. Estabelecimento

O estabelecimento *in vitro* de espécimes de *A. bambusoides* pode ser feito a partir de sementes obtidas de frutos maduros. As sementes devem ser desinfestadas em álcool 70% (v/v) por um minuto, lavadas com água deionizada estéril; e tratadas em hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo) + 0,01% de Tween 20, por 15 minutos. Após o tratamento, lavar por três vezes com água deionizada estéril sempre sob agitação. A inoculação das sementes deve ser feita em meio de cultivo gelificado, contendo o meio MS modificado (50% de sais minerais e 100% de compostos orgânicos) (Murashige e Skoog, 1962).

O pH do meio de cultivo deve ser ajustado para $5,70 \pm 0,01$ e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

O ambiente de incubação deve apresentar temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes (luz do dia, 40 W).

3.5.2. Multiplicação

Quando as plântulas atingirem tamanho mínimo de 15 mm, transferir para o meio de cultivo líquido, contendo 100% dos sais minerais de MS e 26,11 μM de BAP, por um período de sete semanas.

O pH do meio de cultivo, a autoclavagem e o ambiente de incubação devem ser como descritos na etapa de estabelecimento.

3.5.3. Alongamento e enraizamento

Após o período de incubação em meio de multiplicação, transferir as brotações, sem dividi-las, para o meio contendo 100% de sais minerais e 100% de compostos orgânicos do meio de MS, na forma líquida.

O pH do meio de cultivo, a autoclavagem e o ambiente de incubação devem ser como descritos na etapa de estabelecimento.

3.5.4. Aclimatização

Quando as brotações atingirem 40 mm de altura, separá-las e plantá-las em bandejas coletivas contendo aguapé seco e desidratado, sob condições de telado (50% de sombra). A irrigação deve ser feita para manter o substrato úmido, porém nunca encharcado. Recomenda-se aplicar adubação foliar a intervalos semanais, com a formulação 20-20-20 (N P K), na proporção de 2 g L⁻¹.

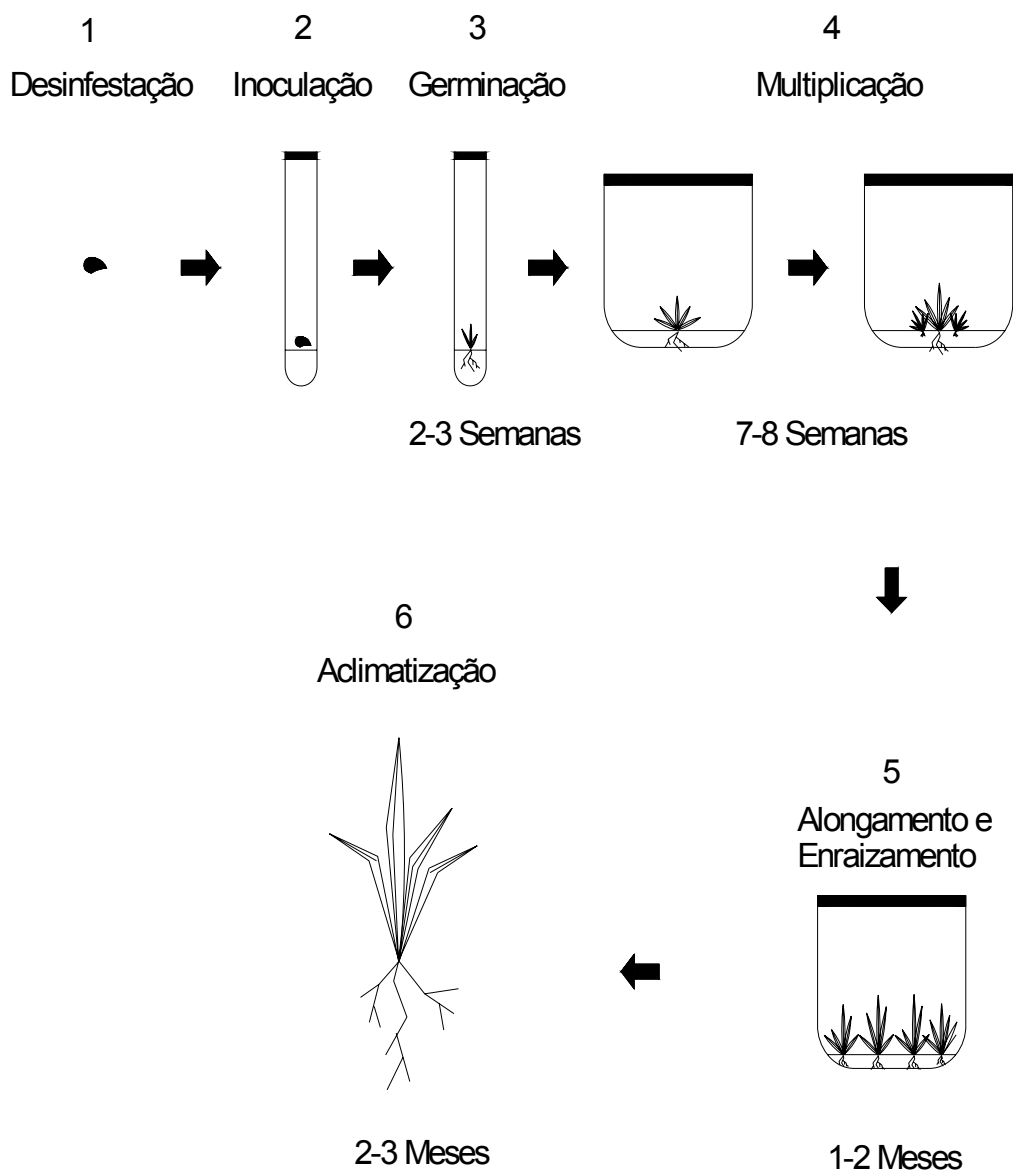


Figura 6: Esquema ilustrativo do protocolo para propagação *in vitro* de *Aechmea bambusoides*.

Referências

Almeida, W. A. B. de.; Matos, A. P. de.; Souza, A. da. S.: Effects of benzilaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). In: Martin-Prével, P.; Hugon, R. (eds) **Proceedings of the second international pineapple symposium**, Trois-Ilets, Martinica, 1995, Acta Horticulturae, 1997.

Bajaj, Y. P. S.: Cryopreservation of plant cell, tissue, organ culture for the conservation of germoplasm and biodiversity. **Biotechnology in Agriculture and**

Forestry 32: 3-47. 1995.

Grattapaglia, D.; Machado, M. A.: **Micropropagação**. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (eds) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, p. 183-260. Embrapa, Brasília. 1998.

IBAMA: **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Portaria Nº 37-N** in <http://home.techno.com.br/vidagua/informa/plan-textin.htm>, 3 de abril de 1992.

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

Leshen, B.; Werker, E.; Shalev, D. P.: The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany** 62: 271-276. 1988.

Luther, H. E.: **An alphabetical list of bromeliad binomials**. Bromeliad Society International, Sarasota, Florida. 120p. 2000.

Mendonça, M. P.; Lins, L. V.: **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Fundação Biodiversitas, Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte. 157p. 2000.

Melo, T. B. de.: As bromélias no paisagismo. **Bromélia** 3: 3-7. 1996.

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

Paula, C. C. de. **Comunicação pessoal**. Departamento de biologia vegetal – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2003.

Paula, C. C. de.; Silva, H. M. P. da.: **Cultivo prático de bromélias**. Editora UFV, Viçosa. 73p. 2001..

Smith, L. B.; Downs, R. J.: **Flora Neotropica**. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Collier-Macmillan Publishers, Nova Iorque. 1-658p. 1974.

Tagliacozzo, G. M. D.: **Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro***. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) *Micropropagação de plantas ornamentais*, p. 58-62. Instituto Agrônomo, Campinas. 1998.

Tombolato, A. F. C.; Takebayashi, S. S. G.; Costa, A. M. M.; Quirino, E. A.: **Bromélia (*Neoregelia carolinae*)**. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) *Micropropagação de plantas ornamentais*, p. 22-24. Instituto Agrônomo, Campinas. 1998.

CAPÍTULO IV

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Quesnelia quesneliana* (Brongniart) L. B. Smith

Resumo

O objetivo deste trabalho foi definir um protocolo eficiente para propagação *in vitro* de *Quesnelia quesneliana*. Para a etapa de multiplicação foram testadas as concentrações de 50% e 100% dos sais minerais de MS combinadas com 0, 10, 20, 40 e 80 μM de BAP. Na etapa de aclimatização testaram-se pó de xaxim, raízes de aguapé e raízes de aguapé com areia (1:1). Concluiu-se que na etapa de multiplicação a concentração de 50% dos sais de MS propiciou maior número de brotações por plântula. Plântulas desenvolvidas em meio de cultura, suplementado com meia força de sais MS foram em média 1,7 mm menores do que às obtidas em meio de cultura com força total de sais. O número de plântulas aumentou na presença de BAP até a concentração estimada de 22,15 μM . Contudo, a presença deste regulador de crescimento no meio de cultura, inibiu o alongamento e a emissão de raízes das brotações. Na aclimatização não houve diferença significativa no índice de sobrevivência entre os substratos. No entanto, para a matéria seca, os melhores tratamentos foram o xaxim e aguapé + areia. Desta forma, a mistura de aguapé + areia (1:1) pode ser utilizada como substituto do xaxim na aclimatização desta espécie.

4.1. Introdução

A espécie *Quesnelia quesneliana* (Brongniart) L. B. Smith é uma Bromeliaceae da subfamília Bromelioideae, de habitat terrestre e sua distribuição ocorre na região costeira (planta da restinga fluminense), entre a vegetação arbustiva e arbórea, próxima ao nível do mar. É uma planta cujas populações nativas vêm sofrendo grande pressão degradativa, por ocorrerem em área de grande ação antrópica, cujo ecossistema encontra-se severamente degradado e onde os fragmentos de vegetação restantes são alvos da especulação imobiliária (Smith e Downs, 1979).

As espécies do subgênero *Quesnelia* são muito utilizadas nos projetos paisagísticos por apresentarem inflorescências róseas, como se fossem tochas incandescentes (Melo, 1996), constituindo-se em uma planta de grande interesse ornamental.

Uma forma eficiente de preservar espécies como a *Q. quesneliana* é a produção de mudas em grande escala, tanto para a recomposição de áreas degradadas, quanto para a comercialização. Atendendo-se assim, a demanda do mercado de plantas ornamentais, diminuindo a pressão extrativista.

A propagação de *Q. quesneliana* é feita normalmente através de sementes ou por brotações axilares. Entretanto, estes métodos de propagação não são eficientes. O cultivo *in vitro* permite a multiplicação rápida, além de proporcionar a obtenção de mudas uniformes, de alta qualidade e livres de doenças (Cabral et al., 1983 e Pierik, 1990). Contudo, a ausência de um protocolo eficiente para a multiplicação *in vitro* tem limitado o emprego desta tecnologia para a propagação desta Bromeliaceae.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi definir um protocolo eficiente para propagação *in vitro* de *Q. quesneliana*.

4.2. Material e métodos

O cultivo *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e a etapa de aclimatização foi realizada na Unidade de Pesquisa

e Conservação de Bromeliaceae (UPCB), do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

4.2.1. Estabelecimento *in vitro*

O estabelecimento *in vitro* de *Quesnelia quesneliana* (Brongniart) L. B. Smith³ foi feito a partir de sementes obtidas de espécimes cultivadas na UPCB. As sementes foram desinfestadas através da imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto, lavadas com água deionizada estéril e, em seguida, imersas em solução de hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo) e 0,01% de Tween 20, por 15 minutos. Em todas as etapas, as sementes foram mantidas sob agitação. Após o tratamento de desinfestação, as sementes foram enxaguadas por três vezes com água deionizada estéril. Em seguida, foram inoculadas em meio de cultivo. Este foi composto de 50% dos sais minerais e 100% de compostos orgânicos do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962). O pH do meio foi ajustado para $5,70 \pm 0,01$ e gelificado com $8,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Grupo Química). Utilizou-se 10 mL de meio em tubos de ensaio (2 5mm x 150 mm) que foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após inoculação, os explantes foram incubados à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram[®], luz do dia, 40 W).

4.2.2. Multiplicação *in vitro*

Na fase de multiplicação *in vitro*, foram testadas cinco concentrações de BAP (0, 10, 20, 40 e $80 \mu\text{M}$) e duas concentrações dos sais minerais de MS (50% e 100%), em um experimento fatorial (5 x 2). O delineamento adotado foi o de blocos completos casualizados (DBC), com seis repetições. Cada bloco foi constituído de plântulas previamente estabelecidas *in vitro*, de tamanho uniforme (mínimo de 10 mm) e sem raízes. Todos os meios de cultivo continham os componentes orgânicos completos do meio MS e o pH ajustado

³ A identificação do material para o recente trabalho fundamentou-se na análise da morfologia vegetativa e floral de espécimes cultivadas na Unidade de Pesquisas e Conservação de Bromeliaceae (UPCB) - UFV, bem como na análise de exsicata (VIC nº 26.466), no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal (Herbário VIC).

para $5,70 \pm 0,01$, antes da esterilização a 121°C e 1,5 atm. por 20 minutos. Foram utilizados recipientes de 350 mL, contendo 15 mL de meio de cultura, onde foi colocada uma plântula. O cultivo foi conduzido em meio líquido estacionário, nas condições de incubação mencionadas anteriormente, por um período de sete semanas, quando as plântulas foram submetidas à avaliação. As características observadas foram o número de plântulas formadas, a altura média das brotações e a presença de raízes nas plântulas.

4.2.3. Alongamento e enraizamento *in vitro*

A etapa de alongamento e enraizamento foi conduzida no mesmo tipo de recipiente da etapa anterior, contendo 15 mL de meio líquido, em condições estacionária. O meio de cultivo foi composto de 50% de sais minerais e 100% de compostos orgânicos de MS. O pH do meio, a esterilização e as condições ambientais de incubação foram como as descritas nas etapas anteriores.

4.2.4. Aclimatização

A etapa de aclimatização foi realizada no período de abril a junho de 2003. Foram selecionadas plântulas de *Q. quesneliana* com 20 a 30 mm de altura, contendo primórdios radiculares. Estas foram plantadas em bandejas de isopor com células de 50 mL. Testou-se xaxim *Dicksonia sellowiana* (Pr.) Hook, aguapé *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms seco e desfiado a mão (proveniente do Setor de Equideocultura da UFV) e a mistura de aguapé mais areia (1:1). O delineamento utilizado foi o DBC com 10 repetições e 12 plantas por parcela. Oito dias após o plantio, as plântulas foram pulverizadas com benlate (2 g L^{-1}). Aos 30 dias foram adubadas com Osmocote® 14-14-14 ($0,03 \text{ g por célula}$) e passaram a receber adubação foliar semanalmente (2 g L^{-1} Peters® 20-20-20). Aos 60 dias foram avaliados a percentagem de sobrevivência, o número de raízes por planta e a matéria seca por planta.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias das características ajustadas à regressão ou comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Estabelecimento *in vitro*

O tratamento de desinfestação das sementes proporcionou uma percentagem de contaminação menor que 1%. A germinação das sementes ocorreu com aproximadamente 15 dias da incubação. O tempo de exposição e a concentração das soluções desinfestantes não prejudicaram a viabilidade das sementes, que possuíam um tegumento rígido. Quando estes propágulos estão protegidos por seus tegumentos, a concentração e o tempo de exposição, ao hipoclorito de sódio, podem ser maiores (Grattapaglia e Machado, 1998). Para a assepsia de gemas de *Neoregelia carolinae*, Tombolato et al. (1998) recomendaram usar hipoclorito de cálcio a 1,5%, por 10 minutos.

A localização do explante na planta e o ambiente em que as plantas matrizes foram mantidas e seu bom aspecto fitossanitário podem ter contribuído também para a baixa percentagem de contaminação. Além disso as sementes utilizadas neste experimento foram extraídas de frutos intactos, nos quais as sementes se encontravam protegidas por uma mucilagem.

4.3.2. Multiplicação *in vitro*

Após uma semana de incubação, observou-se o surgimento das brotações em alguns tratamentos. Em avaliação conduzida após sete semanas de incubação observou-se que a concentração de 50% dos sais minerais de MS promoveu maior número de brotações (Figura 2A). Dependendo da espécie, ou até mesmo dentro da espécie, a concentração dos nutrientes minerais no meio de cultura pode influenciar a multiplicação *in vitro*. Algumas vezes o excesso de nutrientes pode inibir a multiplicação (George, 1993), o que pode ter ocorrido neste experimento.

As brotações desenvolvidas em meio de cultura com meia força de sais MS foram em média 1,7 mm menores do que as brotações desenvolvidas em meio de cultura com força total (Figura 2B). Esta menor altura pode ser devido à maior competição entre estas por nutrientes, pois este meio propiciou maior número de brotações. Entretanto, a altura das brotações é um fator pouco relevante na etapa de multiplicação, pois estas brotações serão submetidas a

uma etapa de alongamento e enraizamento, antes da aclimatização. Desta forma, a utilização do meio de cultura com 50% de sais MS é desejável sob o ponto de vista econômico.

O BAP foi efetivo na indução de brotações de *Q. quesneliana*, sendo que a produção máxima estimada foi alcançada a 22,15 μM , com 17,5 brotações por plântula (Figura 1A). Acima desta concentração, o BAP mostrou-se inibitório ao processo de brotação. Estes resultados demonstram a viabilidade da multiplicação de *Q. quesneliana* sem a adição de auxina no meio de cultura, contrastando com os resultados de Hosoki e Asahira (1980), que concluíram pela necessidade do uso da combinação do BAP com ANA para a multiplicação *in vitro* desta espécie de bromélia.

O BAP teve efeito inibitório na altura das plântulas (Figura 1B). Este efeito pode ser devido a menor relação auxina/citocinina (Hinojosa, 2000) e também ao aumento do número de plântulas, induzido por esta citocinina, o que aumenta a competição entre as brotações por espaço e nutrientes. Estes fatores, geralmente, se encontram limitados dentro do frasco de cultura *in vitro*. O BAP também se mostrou inibitório ao processo de enraizamento. Desta forma, a formação de raízes foi observada somente em plântulas obtidas em tratamentos nos quais não havia a presença de BAP.

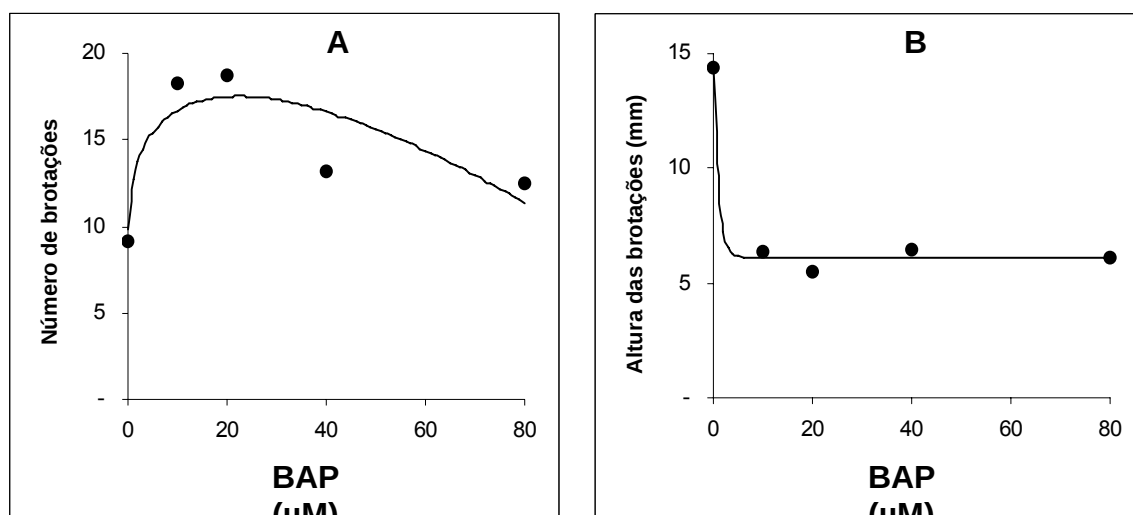


Figura 1: Estimativa do efeito do BAP no número de brotações (A) e na altura média das brotações (B) de *Quesnelia quesneliana*. (A: $\hat{Y} = 9,864359 - 0,34371412X + 3,2438054X^{0,5}$, $R^2 = 0,75$; B: $\hat{Y} = 6,0929973^{**} + 8,2810616^{**}e^{-X}$, $R^2 = 0,98$).

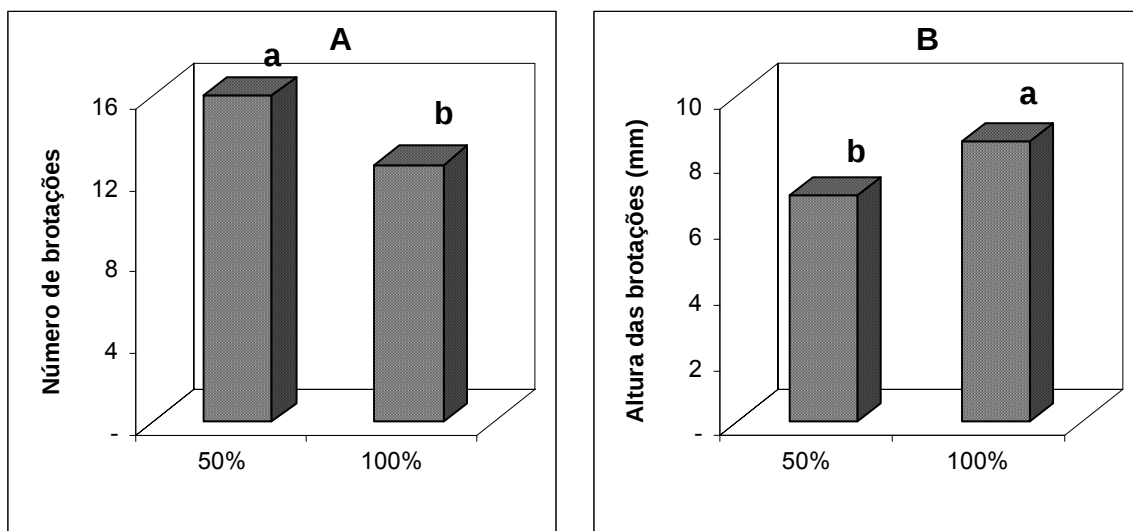


Figura 2: Efeito da concentração de sais de MS no número de brotações (A) e na altura das brotações (B) de *Quesnelia quesneliana*. Médias seguidas por letra diferente, diferem significativamente pelo teste F ($P \leq 0,05$, A; $P \leq 0,01$, B).

4.3.3. Alongamento e enraizamento

Após sete semanas de incubação, observou-se que o processo de alongamento e de enraizamento das brotações não era sincronizado. O surgimento de novas brotações era comum durante esta fase do cultivo, o que, provavelmente, deve estar relacionada ao efeito residual do BAP. A falta de sincronização pode ter ocorrido, também, devido à grande variabilidade genética das plântulas empregadas neste trabalho, uma vez que estas foram obtidas de sementes. Uma prática comum na produção de mudas *in vitro* é a separação e a seleção de brotações de tamanho adequado para a aclimatização, recultivando-se as demais até atingirem o tamanho requerido.

4.3.4. Aclimatização

A percentagem média de sobrevivência das plantas, durante a aclimatização, não diferiu entre os substratos (Figura 3A). Contudo, o número de raízes por planta, foi significativamente superior no xaxim aos demais substratos (Figura 3B). A matéria seca acumulada foi superior nas plantas aclimatizadas no xaxim e aguapé + areia às aclimatizadas em substrato que continha somente o aguapé (Figura 4). O maior incremento em matéria seca observado nas plantas aclimatizadas em xaxim e aguapé + areia pode ser devido às melhores características físicas destes substratos, que

proporcionaram maior aeração e drenagem. De com Costa (1998), na aclimatização o substrato deve ser suficientemente poroso para promover drenagem e a aeração adequada. Um substrato que apresenta aeração adequada possibilita melhor formação do sistema radicular das plantas e, conseqüentemente, maior desenvolvimento. Neste trabalho, pode-se observar maior quantidade de raízes em plantas aclimatizadas em xaxim, confirmando as qualidades já conhecidas deste substrato para as bromélias (Paula e Silva, 2001). Entretanto, o xaxim é uma planta ameaçada de extinção (Bellé, 2000; Stancato et al., 2000; Demattê e Graziano, 2000), sendo necessária a sua substituição. A mistura de aguapé + areia pode ser uma alternativa ao xaxim na aclimatização de *Q. quesneliana*, uma vez que o peso da matéria seca acumulada por planta, nesta espécie, quando aclimatizada em aguapé + areia, não diferiu estatisticamente do peso observado quando aclimatizado em xaxim.

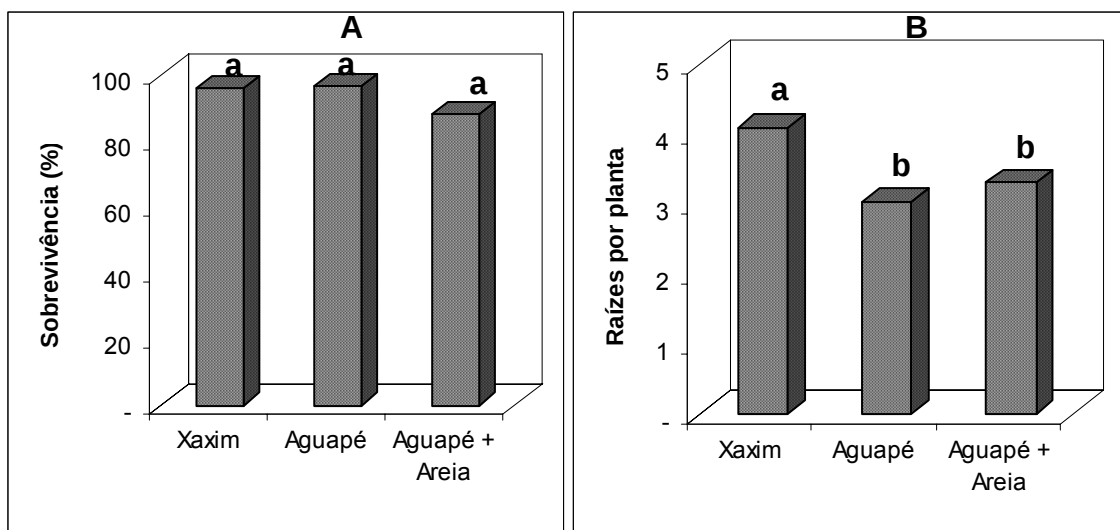


Figura 3: Efeito do substrato na percentagem de sobrevivência das plantas (A) e no número de raízes emitidas durante a aclimatização de *Quesnelia quesneliana*. Médias seguidas por letra diferente, diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

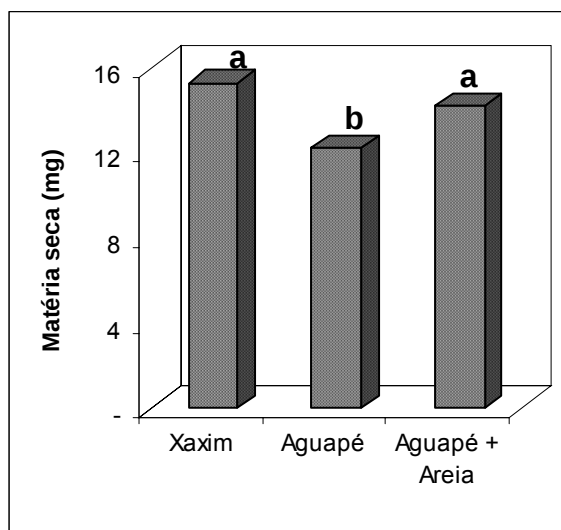


Figura 4: Efeito do substrato na percentagem de sobrevivência das plantas de *Quesnelia quesneliana*. Médias seguidas por letra diferente, diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4.4. Conclusões

No presente trabalho de pesquisa concluiu-se que é viável a propagação *in vitro* de *Q. quesneliana*.

Na etapa de multiplicação observou-se que a concentração de 50% dos sais minerais de MS propiciou maior número de brotações por plântula.

Plântulas desenvolvidas em meio de cultura contendo a meia força de sais minerais de MS foram em média 1,7 mm menores do que as obtidas em meio de cultura com força total de sais.

O número de plântulas aumentou na presença de BAP até a concentração estimada de 22,15 μM . Contudo, a presença deste regulador de crescimento no meio de cultura, inibiu o alongamento e a emissão de raízes das brotações.

Na aclimatização não houve diferença significativa no índice de sobrevivência entre os substratos. No entanto, para a matéria seca, os melhores tratamentos foram o xaxim e aguapé + areia. Desta forma, a mistura de aguapé + areia (1:1) pode ser utilizada como substituto do xaxim na aclimatização desta espécie.

4.5. Protocolo

4.5.1. Estabelecimento

O estabelecimento *in vitro* de espécimes de *Q. quesneliana* pode ser feito a partir de sementes obtidas de frutos maduros. As sementes devem ser desinfestadas em álcool 70% (v/v) por um minuto; lavadas com água deionizada estéril e tratadas em hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo) + 0,01% de Tween 20 por 15 minutos. Após o tratamento, lavar por três vezes com água deionizada estéril, sempre sob agitação. A inoculação das sementes deve ser feita em meio de cultivo gelificado, contendo o meio MS modificado (50% de sais minerais e 100% de compostos orgânicos) (Murashige e Skoog, 1962).

O pH do meio de cultivo deve ser ajustado para $5,70 \pm 0,01$ e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

O ambiente de incubação deve apresentar temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes (luz do dia, 40 W).

4.5.2. Multiplicação

Quando as plântulas atingirem tamanho mínimo de 15 mm transferir para o meio de cultivo líquido, contendo 50% dos sais minerais de MS e 22,15 μM de BAP, por um período de sete semanas.

O pH do meio de cultivo, a autoclavagem e o ambiente de incubação devem ser como descritos na etapa de estabelecimento.

4.5.3. Alongamento e enraizamento

Após o período de incubação em meio de multiplicação, transferir as brotações, sem dividi-las, para o meio MS modificado, na forma líquida.

O pH do meio de cultivo, a autoclavagem e o ambiente de incubação devem ser como descritos na etapa de estabelecimento.

4.5.4. Aclimatização

Quando as brotações atingirem 20 a 30 mm de altura, separá-las e plantá-las em bandejas coletivas contendo aguapé + areia (1:1), sob condições de telado (50% de sombra). A irrigação deve ser feita para manter o substrato úmido, porém nunca encharcado. Recomenda-se aplicar adubação foliar a intervalos semanais, com a formulação 20-20-20 (N P K), na proporção de 2 g L⁻¹.

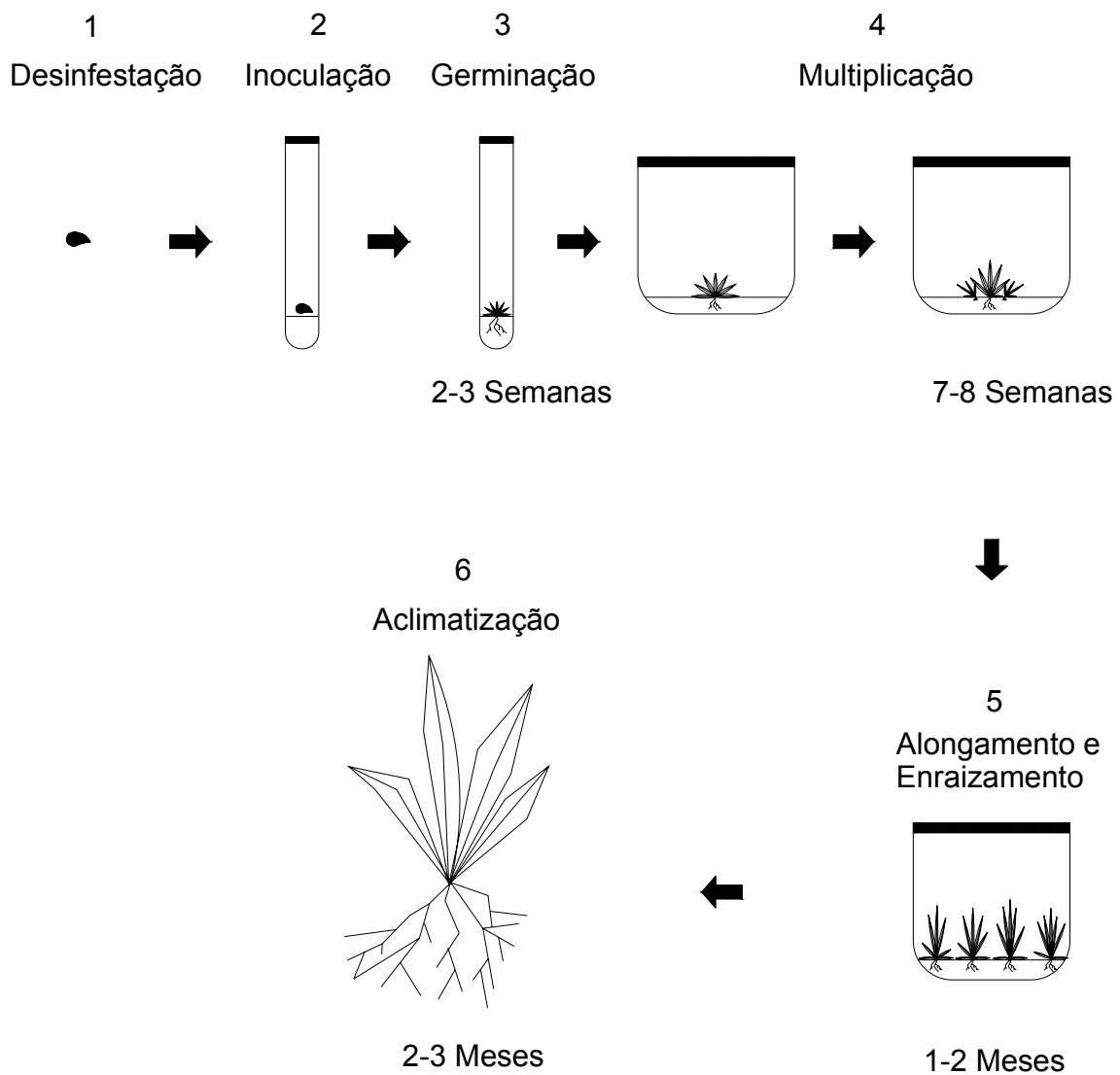


Figura 5: Esquema ilustrativo do protocolo para propagação *in vitro* de *Quesnelia quesneliana*.

Referências

- Bellé, S.: Substituição da fibra de xaxim por casca de pinus no cultivo de *Maxilaria consanguinea*. In: Kämpf, A. N.; Fermino, M. H. (eds) **1º. Encontro Nacional Sobre Substrato para Plantas**, p. 183-189, Porto Alegre, 1999, Genesis, 2000.
- Cabral, J. R. S.; Cunha, G. A. P.; Rodrigues, E. M.: **Propagação do abacaxi "in vitro"**, p. 2. Embrapa, Cruz das Almas. 1983.
- Costa, A. M. M.: **Fisiologia da aclimação**. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) Micropropagação de plantas ornamentais, p. 63-67. Instituto Agrônomo, Campinas. 1998.
- Demattê, M. E. S. P.; Graziano, T. T.: Growth of *Dendrobium nobile* Lindl. as related with nutrient concentration in the growing media, 2000, Acta Horticulturae.
- George, E. F.: **Plant propagation by tissue culture, Part 1: The technology**. Exegetics Limited, Edington. 1993.
- Grattapaglia, D.; Machado, M. A.: **Micropropagação**. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (eds) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, pp. 183-260. Embrapa, Brasília. 1998.
- Hinojosa, G. F.: **Auxinas**. In: Cid, L. P. B. (ed) Introdução aos hormônios vegetais, p. 15-53. Embrapa, Brasília. 2000.
- Hosoki, T.; Asahira, T.: In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience** 15: 603-604. 1980.
- Melo, T. B. de.: As bromélias no paisagismo. **Bromélia** 3: 3-7. 1996.
- Murashige, T.; Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497. 1962.
- Paula, C. C. de.; Silva, H. M. P. da.: **Cultivo prático de bromélias**. Editora UFV, Viçosa. 73p. 2001.
- Pierik, R. L. M.: **Germinacion de semillas de orquidea**. In: Pierik, R. L. M. (ed) Cultivo in vitro de las plantas superiores, p. 149-157. Ediciones Mundi-Prensa, Madri. 1990.
- Smith, L. B.; Downs, R. J.: **Flora Neotropica**. Bromelioideae (Bromeliaceae). The New York Botanical Garden, Nova Iorque. 1491-2142p. 1979.
- Stancato, G. C.; Abreu, M. F.; Berton, R.; Kerbauy, G. B.: Cultivo de plantas de *dendrobium nobile* cv. Gilblank (Orchidaceae) em substratos contendo xaxim ou casca de coníferas. In: Kämpf, A. N.; Fermino, M. H. (eds) **1º. Encontro**

Nacional Sobre Substrato para Plantas, p. 197-201, Porto Alegre, 1999, Genesis, 2000.

Tombolato, A. F. C.; Takebayashi, S. S. G.; Costa, A. M. M.; Quirino, E. A.: **Bromélia (*Neoregelia carolinae*)**. In: Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. (eds) Micropropagação de plantas ornamentais, p. 22-24. Instituto Agronômico, Campinas. 1998.

CONCLUSÕES

Os protocolos para propagação *in vitro* das três espécies estudadas compreende as seguintes etapas: estabelecimento, multiplicação, alongamento e enraizamento e aclimatização.

No estabelecimento, o tratamento de desinfestação das sementes, propiciou percentagem de contaminação menor que um 1%, para as três espécies.

Na etapa de multiplicação, as duas concentrações de sais de MS não influenciaram as características avaliadas em *A. strobilacea*. Para *A. bambusoides*, o meio MS não modificado propiciou maior número de brotações. Em *Q. quesneliana* obteve-se maior número de brotações no meio MS modificado para de 50% dos sais.

Em *A. bambusoides*, na ausência de BAP, a altura das brotações foi maior no meio MS não modificado.

O BAP estimulou maior número de brotações até as concentrações estimadas de 26,80 μ M em *A. strobilacea*, propiciando 60,7 brotações; 26,11 μ M em *A. bambusoides*, propiciando 18,4 brotações e 22,15 μ M em *Q. quesneliana* propiciando 17,5 brotações.

A presença de BAP no meio de cultivo inibiu o alongamento das brotações e a emissão de raízes.

Na etapa de alongamento e enraizamento, os resultados obtidos indicam que, para *A. strobilacea* e *Q. quesneliana* se deve utilizar o meio MS com 50%

dos sais minerais e para *A. bambusoides* é recomendado utilizar o meio MS não modificado.

O aguapé pode ser utilizado como substrato alternativo ao xaxim na aclimatização de *A. strobilacea* e *A. bambusoides*. Na aclimatização de *Q. quesneliana* pode-se usar como substrato a mistura de aguapé + areia na proporção de 1:1.