



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE BROMÉLIA ENDÊMICA DA CHAPADA DIAMANTINA- BA

**Fernanda de Jesus Oliveira Bastos¹; Andressa Priscila Piancó Santos Lima²;
Alone Lima-Brito³ e José Raniere Ferreira de Santana⁴**

1. Bolsista FAPESB, Graduanda em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: nandahhbastos@hotmail.com
2. Doutoranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: andressapianco@gmail.com
3. Professora, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lima_brito@yahoo.com.br
4. Orientador, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jose.raniere@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo *in vitro* ; Crescimento lento; Bromélia.

INTRODUÇÃO

Neoregelia mucugensis é uma espécie típica dos campos rupestres, e ocorre no Parque Nacional da Chapada Diamantina, contudo não é considerada protegida devido às extensas queimadas que anualmente atingem esta região (Bellintani, 2006). O que torna necessária a realização de estudos que visem a conservação dessa espécie.

Desse modo a cultura de tecidos vegetais pode ser uma opção viável para a conservação *ex situ* de *N. mucugensis* através da técnica de conservação *in vitro*. A indução do crescimento lento é um dos métodos de conservação *in vitro* que se baseia na redução do metabolismo da planta sem causar prejuízo à sua viabilidade (Lemos *et al.*, 2002). Esta indução pode ser realizada por meio adição de agentes osmóticos no meio de cultura (Canto, 2004), e também pela redução de sais do meio.

Não há relatos na literatura de trabalhos de conservação *in vitro* com *Neoregelia mucugensis*, o que sugere a necessidade de estudos neste sentido, visto que esta espécie endêmica se encontra em situação de vulnerabilidade. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* para *Neoregelia mucugensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi obtido a partir de sementes de *Neoregelia mucugensis* coletadas no Parque Municipal de Mucugê, em Mucugê – Chapada Diamantina - Bahia. O estabelecimento *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Bellintani (2006). Plântulas de *N. mucugensis* germinadas *in vitro* com aproximadamente 2 cm de comprimento foram utilizadas como explante.

As plântulas foram inseridas em tubos de ensaio contendo 18 ml de meio de cultura MS com metade (MS ½) ou um terço (MS 1/3) dos sais, acrescido de 45 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar e duas concentrações de manitol 7,8 g.L⁻¹ ou 15,6 g.L⁻¹. Com arranjo fatorial de 2 x 2, totalizando quatro tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 50 tubos por tratamento. Cada tratamento composto de dez repetições e cinco amostras por repetição. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização realizada em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Após 300 dias de conservação foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência (%S), considerando todas as amostras de cada tratamento. Já para as análises de

crescimento foram utilizadas 15 amostras de cada tratamento sendo avaliados: número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), matéria fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), o teor de clorofila e a capacidade regenerativa.

A determinação do teor de clorofila foi realizada de acordo com a metodologia de Arnon (1949) com ajustes. As análises foram realizadas em triplicata para cada tratamento.

Para a capacidade regenerativa explantes caulinares oriundos das plantas conservadas *in vitro* por 300 dias foram induzidos a regeneração com 2,22 μM de BAP combinado com 1,30 μM de ANA (Bellintani et al., 2008). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 15 repetições. Após 30 dias foram avaliadas a porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos (%ERB) e o número de brotos por explante (NBE).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sobre temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16h e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1 (FERREIRA, 2003) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A análise de variância apontou efeito não significativo ($p \geq 0,05$) para as variáveis porcentagem de sobrevivência (%S), comprimento da maior raiz (CMR), massa fresca da raiz (MFR) e massa seca da raiz (MSR) (Tabela 1). No entanto, as plantas apresentaram altas taxas de sobrevivência que variam entre 92% e 96% após 300 dias de conservação.

A interação entre redução de sais e manitol foi significativa ($p \leq 0,05$) para as variáveis número de folhas verdes (NFV), número de raízes (NR), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA). Para o número de folhas senescentes (NFS) houve efeito significativo e isolado do manitol.

Para o NFV a maior média foi de 8,13 no tratamento com a redução de sais para $\frac{1}{2}$ associado com $15,6 \text{ g.L}^{-1}$ de manitol (Tabela 1). É interessante que se tenha um maior número de folhas verdes pois isso implica na quantidade de explantes disponíveis para a multiplicação *in vitro*.

Com relação ao NR a média obtida, apontou que a concentração de $7,8 \text{ g.L}^{-1}$ do manitol juntamente $\frac{1}{2}$ dos sais do meio MS promoveu a diminuição do número de raízes quando comparado com as concentrações de $15,6 \text{ g.L}^{-1}$ de manitol.

Para o CPA a menor média alcançada para está variável foi de 5,01 com $\frac{1}{2}$ da concentração dos sais associado $7,8 \text{ g.L}^{-1}$ de manitol, a MFPA e MSPA as maiores médias foram 1,06 e 0,19 respectivamente, com $7,8 \text{ g.L}^{-1}$ de manitol e meio MS com $\frac{1}{3}$ das concentrações salinas. Em relação ao número de folhas senescentes a menor média foi obtida na concentração de $15,6 \text{ g.L}^{-1}$ de manitol com 11,90 NFS (Tabela 2).

Para o teor de clorofila das plantas conservadas o (T3) com $\frac{1}{2}$ dos sais associado com $15,6 \text{ g.L}^{-1}$ de manitol apresentou médias inferiores aos demais tratamentos para todas as clorofilas analisadas. Quanto ao (T1) e (T3) os valores da clorofila *a* e *b* foram equivalentes em seus respectivos tratamentos e para o (T2) e o (T4) a clorofila *a* foi superior a *b* (Figura 1).

Tabela 1. Efeito da redução de sais no meio MS e do manitol no número de folhas verdes (NFV), número de raiz (NR), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de *Neoregelia mucugensis* conservadas *in vitro* durante 300 dias.

NFV		
	Manitol	
Redução de sais	7,8 g.L ⁻¹	15,6 g.L ⁻¹
MS ^{1/2}	5,73 Ab	8,13 Aa
MS ^{1/3}	5,80 Aa	6,06 Ba
NR		
Redução de sais	7,8 g.L ⁻¹	15,6 g.L ⁻¹
MS ^{1/2}	10,26 Bb	19,13 Aa
MS ^{1/3}	15,40 Aa	14,46 Aa
CPA (cm)		
Redução de sais	7,8 g.L ⁻¹	15,6 g.L ⁻¹
MS ^{1/2}	5,01 Ba	5,44 Aa
MS ^{1/3}	7,62 Aa	4,94 Ab
MFPA (g)		
Redução de sais	7,8 g.L ⁻¹	15,6 g.L ⁻¹
MS ^{1/2}	0,60 Ba	0,83 Aa
MS ^{1/3}	1,06 Aa	0,58 Ab
MSPA (g)		
Redução de sais	7,8 g.L ⁻¹	15,6 g.L ⁻¹
MS ^{1/2}	0,12 Bb	0,16 Aa
MS ^{1/3}	0,19 Aa	0,12 Bb

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Efeito do manitol no número de folhas senescentes (NFS) das plantas de *Neoregelia mucugensis* conservadas *in vitro* durante 300 dias.

Manitol	NFS
7,8 g.L ⁻¹	15,6A
15,6 g.L ⁻¹	11,9B

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

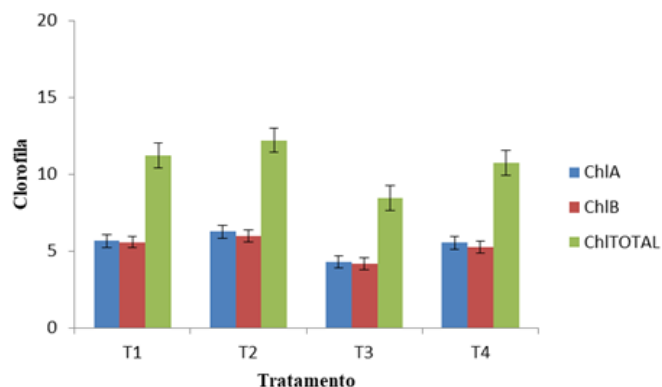


Figura 1. Determinação do teor de clorofila a, b e de clorofila total das plantas de *Neoregelia mucugensis* conservadas *in vitro*.

De modo geral as plantas conservadas mantiveram sua capacidade regenerativa por meio da organogênese direta a partir explantes caulinares. A análise de variância foi

significativa ($p \leq 0,05$) para a porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos (%ERB) e para o número de brotos por explante (NBE).

Para a %ERB as taxas obtidas no T1 (75%) e no T2 (70%) foram significativamente superior a do T4 (15%), e não diferiram estatisticamente do T3 (45%). Quanto ao número de brotos por explante (NBE) as médias encontradas nos tratamentos T1 (2,20) e T2 (2,15) forma superiores a do T4 (0,30), mas não apresentaram diferença significativa com relação o T3 (1,10) (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de explantes responsivos a formação de brotos (%ERB) e número de brotos por explantes sobre efeito de BAP X ANA em segmentos caulinares de plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos de redução de sais e manitol.

%ERB			
Tratamento	Redução dos sais	Manitol	BAP X ANA
1	MS $\frac{1}{2}$	7,8 g.L ⁻¹	75 a
2	MS $\frac{1}{3}$	7,8 g.L ⁻¹	70 a
3	MS $\frac{1}{2}$	15,6 g.L ⁻¹	45 ab
4	MS $\frac{1}{3}$	15,6 g.L ⁻¹	15 b
NBE			
Tratamento	Redução dos sais	Manitol	BAP X ANA
1	MS $\frac{1}{2}$	7,8 g.L ⁻¹	2,20 a
2	MS $\frac{1}{3}$	7,8 g.L ⁻¹	2,15 a
3	MS $\frac{1}{2}$	15,6 g.L ⁻¹	1,10 ab
4	MS $\frac{1}{3}$	15,6 g.L ⁻¹	0,30 b

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A redução das concentrações salinas do meio MS associado com o manitol permite a conservação *in vitro* de *Neoregelia mucugensis* por 300 dias sem comprometer sua capacidade regenerativa.

REFERÊNCIAS

- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts -polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, v.24, p.1-15, 1949.
- BELLINTANI, M. C. Estudos da propagação *in vitro* e *ex vitro* de *Neoregelia mucugensis* Leme, *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição e *Orthophytum albopictum* Philcox, espécies de Bromeliaceae endêmicas da Bahia. 2006. 115p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.
- CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.
- FERREIRA, D.F. SISVAR Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003. V.3, n.4.
- LEMONS, E. E. P. de, et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuaria brasileira, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.
- SOUZA, A da S. et al. Preservação de Germoplasma Vegetal, com Ênfase na Conservação *in vitro* de Variedades de Mandioca. Circular Técnica. Cruz das Almas, Ba, 2009.
- SOUZA, E. L. S. Conservação de Germoplasma *in vitro*. In: Encontro sobre recursos genéticos. Anais. Jaboticabal, 1988