

MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Neoregelia mucugensis* Leme

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

1. Bolsista PROBIC/UEFS, 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.raniera@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: calogênese; broto; bromélia.

INTRODUÇÃO

Neoregelia mucugensis Leme 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 este Parque (BELLINTANI, 2006), o que requer estratégias para a sua propagação e conservação.

Neste contexto, a cultura de tecidos vegetais pode ser uma alternativa viável para a propagação desta espécie através da micropropagação.

Esta técnica pode ser desenvolvida através da organogênese a qual ocorre por duas vias distintas: a direta e a indireta. Na organogênese indireta há a necessidade de desdiferenciação do explante, originando calo antes do estabelecimento das células competentes (BERTOZZO; MACHADO, 2010), portanto, por serem massa celulares indiferenciadas, os calos têm facilidade na regeneração *in vitro* (KERBAUY, 1997), e permitem a obtenção de elevada taxa de multiplicação.

Neste processo é importante o balanço entre auxina e citocinina. As auxinas atuam na formação de calos, indução do desenvolvimento de nós e de raízes adventícias (CARVALHO; VIDAL, 2003). Já as citocininas induzem, na presença de auxinas, a divisão celular em calos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Há relatos na literatura de trabalhos com o cultivo *in vitro* de *N. mucugensis* como estabelecimento *in vitro* (BELLINTANI et al., 2007) e multiplicação via organogênese direta (BELLINTANI et al., 2008). No entanto, os autores consideram estas taxas baixas e sugerem que novas pesquisas sejam realizadas a fim de aumentar a taxa proliferativa. Isto pode ser feito por estudos de organogênese indireta, visto que em geral esta via potencializa a regeneração de brotos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes reguladores na morfogênese de *Neoregelia mucugensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e meio de cultura

Plantas germinadas *in vitro* com 5 meses de idade foram utilizadas como fonte de explantes para realização do experimento. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura. O meio utilizado foi o MS ½ contendo 30g/L-1 de sacarose e 7g/L-1 de ágar (meio básico). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sendo realizada à 121°C por 15 minutos.

Efeito do 6-benzilaminopurina – BAP e ácido naftaleno acético – ANA em explantes foliares e caulinares de *Neoregelia mucugensis*.

Explantes caulinares com 0,5 cm e foliares com 1 cm de comprimento, foram inoculados em meio de cultura básico acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,00; 4,44; 6,66; 8,88; 11,10 µM) e ANA (0,00; 2,60; 5,20 µM). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial de 2 x 5 x 3 (dois tipos de explante, cinco

concentrações de BAP e três concentrações de ANA) totalizando 30 tratamentos cada um composto por cinco repetições com cinco amostras cada e um explante por amostra. Após 60 dias da montagem, foram avaliadas as variáveis porcentagem de explantes com calo (%EC), área do explante coberta por calo (AEC), coloração e textura dos calos, porcentagem de explantes com broto (%EB) e número de brotos por explante (NBE).

Efeito do picloram na indução de calos em explantes foliares de *Neoregelia mucugensis*

Explantes foliares com 1 cm de comprimento, foram inoculados em meio de cultura básico acrescido de diferentes concentrações de picloram (0,00; 5; 10; 15; 20 μ M). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, cada um com seis repetições com quatro amostras cada e um explante por amostra. Após 60 dias da montagem, foram avaliadas as variáveis porcentagem de explantes com calo (%EC), coloração e textura dos calos.

Condições experimentais

O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 3^\circ$ C, e mantido no escuro.

Análise dos dados

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

RESULTADOS

A análise de variância apontou efeito significativo ($p \leq 0,05$) apenas para o tipo de explante, nas duas variáveis avaliadas: porcentagem de explantes responsivos (%ER) e número de brotos por explante (NBE).

Para ambas as variáveis (%ER e NBE) o explante caulinar apresentou diferença estatística significativamente superior ao explante foliar (Tabela 1), isto pode ter ocorrido devido a maior presença de tecido meristemático e gemas laterais no explante caulinar, visto que a formação de brotos ocorreu por organogênese direta. Não foi observada a presença de calos em ambos os tipos de explantes. Estes resultados indicam que as concentrações dos reguladores utilizadas não foram eficientes para induzir a regeneração de brotos por organogênese indireta.

As concentrações dos reguladores utilizados não apresentaram diferença estatística significativa, no entanto a regeneração de brotos ocorreu em todos os tratamentos testados para o explante caulinar, inclusive na ausência de reguladores vegetais, o que é vantajoso pois reduz os custos de produção.

Resultado divergente foi encontrado por Bellintani et al. (2008) em estudo realizado também com *Neoregelia mucugensis* no qual as melhores taxas de regeneração de brotos a partir de explantes caulinares por organogênese direta ocorreu na combinação de 2,22 ou 4,44 μ M de BAP com 1,30 μ M de ANA, e houve formação de calos em 10,2% dos explantes após 4 meses de cultivo *in vitro*.

A formação de brotos pela via direta da organogênese também foi observada por Carneiro et al. (1999) que avaliaram o efeito da combinação de diferentes concentrações de BAP e ANA em explantes foliares de *Neoregelia cruenta* e obtiveram os melhores resultados para porcentagem de explantes com brotos e número de brotos por explantes na associação desses reguladores.

Tabela 1. Porcentagem de explante responsivo (%ER) e número de brotos por explante (NBE) em função do tipo de explante.

Explante	%ER	NBE
Folha	0 B	0 B
Caule	68,77 A	1,92 A

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A ocorrência da regeneração de brotos por organogênese indireta foi obtida por Lima (2016) em estudo com *Orthophytum mucugense* a partir de explantes foliares na interação entre ANA e BAP. O mesmo foi relatado em estudos realizados por Pineda, Vargas e García (2014) que utilizando segmentos foliares basais de *Ananas comosus* (L.) Merr conseguiram na combinação de 26,85 μM de ANA com 1,11 μM de BAP brotos formados a partir de calos, diferindo do resultado demonstrado no presente trabalho com *N. mucugensis* no qual a regeneração pela via indireta não foi obtida.

Visando aumentar a taxa proliferativa da espécie outras concentrações desses reguladores vegetais podem ser testadas.

Para o uso do picloram, a análise de variância apontou efeito significativo ($p \leq 0,05$) para as concentrações de picloram na variável porcentagem de explante responsivos (%ER). Não houve formação de calos na ausência de regulador vegetal, esta foi observada nos explantes sob efeito do picloram, que apresentaram textura friável e coloração bege.

Em relação ao efeito do picloram sobre a %ER a análise de regressão apresentou o modelo polinomial quadrático como mais representativo para esta variável, demonstrando que o acréscimo desse regulador ao meio de cultura promoveu um aumento na taxa de explantes com formação de calos atingindo o ponto máximo na concentração de 12,96 μM com valor máximo estimado de 75,96% (Figura 1). A partir deste ponto ocorre uma diminuição na taxa de explantes responsivos. Nota-se que na ausência de regulador não houve formação de calos, isto demonstra a importância dessa auxina nesse processo, corroborando Pacheco et al. (2012) que afirmam que o picloram é uma auxina que promove alta indução de calos.

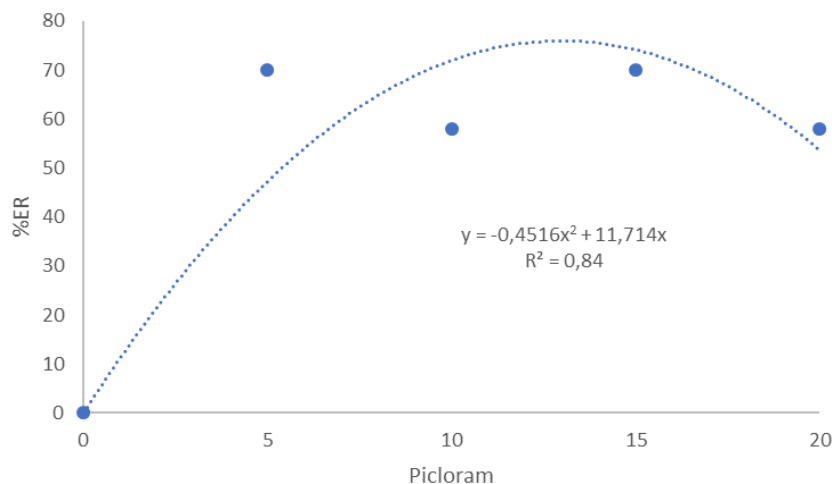


Figura 1. Porcentagem de explantes responsivos (%ER) em função de diferentes concentrações de Picloram em explantes foliares de *Neoregelia mucugensis* após 60 dias de cultivo *in vitro*. *Significativo a 5% de probabilidade.

Estes resultados podem indicar que possivelmente os explantes foliares de *N. mucugensis* já apresentam alta concentração de auxina endógena, sendo a aplicação exógena

de baixas concentrações suficientes para induzir a formação de calo, tendo efeito inibitório para as concentrações mais elevadas.

Os vegetais possuem, naturalmente, hormônios vegetais, que em baixas concentrações podem induzir, modificar ou inibir seus processos fisiológicos, e com ações semelhantes a estes há reguladores vegetais sintéticos que podem ocasionar tanto a promoção quanto a inibição de processos metabólicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta (ALBUQUERQUE; MOUCO; ALBUQUERQUE NETO, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os reguladores vegetais BAP e ANA, nas concentrações utilizadas, não são eficientes para a regeneração de brotos via organogênese indireta em explantes foliares e caulinares. A organogênese direta de *N. mucugensis* é obtida a partir do explante caule em meio livre de regulador vegetal. O uso da auxina Picloram promove a calogênese no explante folha de *N. mucugensis*.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. C. S. de; MOUCO, M. A. do C.; ALBUQUERQUE NETO, A. A. de. Reguladores de crescimento vegetal na concentração de macronutrientes em videira Itália. *Bragantia*, p. 553-561, 2008.
- BELLINTANI, M. C. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1101-1103, jul. 2007.
- BELLINTANI, M.C. et al. Resposta regenerativa *in vitro* de explantes caulinares de bromélias endêmicas da Chapada Diamantina– Bahia. *Magistra*, v.20, n.4, p.328-337, 2008.
- BERTOZZO, F., MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.
- CARNEIRO L. A. et al. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 55:79-83, 1999.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. Campina Grande, 2003.
- FERREIRA, D.F. SISVAR Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, v.3, n.4. 2003.
- KERBAUY, G. B. Clonagem de Plantas *in vitro*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 1997.
- LIMA, A.P.P.S. Micropropagação e conservação *in vitro* de *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição. 2016. 92f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.
- PACHECO G, G. R, L. D, V. M & M. E Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Scientia Horticulturae*, 144:42-47, 2012.
- PINEDA, A.; VARGAS, T. E.; GARCÍA, E. G. de. Regeneración de *Ananas comosus* (L.) merr, ecotipo tabë känä, mediante organogênese indirecta. *Bioagro*, v. 26, n. 3, p. 135-142, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2013.