



## Propagação *in vitro* a partir de sementes e segmentos nodais de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch

**Victória de Carvalho**<sup>(1)</sup>, Daniela Soares dos Santos<sup>(1,2)</sup>, Vívian Tamaki<sup>(1)</sup> & Catarina Carvalho Nievola<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, victoria.oak@gmail.com; <sup>(2)</sup>Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica.

**Resumo:** A micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch pode ser realizada através do uso de dois explantes: sementes e segmentos nodais. O objetivo deste trabalho é comparar as características das plantas obtidas destes explantes, durante seu desenvolvimento inicial. Os segmentos nodais usados foram isolados de plantas alongadas mantidas por dois meses em meio de cultura de Murashige & Skoog com 1/5 de macronutrientes da formulação original (MS/5), 2% de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, pH 5,8 e com 5 g L<sup>-1</sup> de ágar. Foram utilizados 60 segmentos nodais (tratamento N) e 60 sementes (tratamento S) distribuídos em 24 frascos com MS/5 (5 explantes por frasco), mantidos a 26 °C. Após 15 dias de cultivo, 15 plantas obtidas de S atingiram o tamanho médio de 1,9 cm de folha e 1,7 cm de raiz, enquanto que foram necessários 24 dias para que ocorresse esse desenvolvimento nas plantas de N. A comparação do crescimento de 120 plantas provenientes de cada explante (nós e sementes) que foram depositadas em oito frascos com novo meio MS/5 e mantidas sob 25 °C em câmara de crescimento (quatro frascos por tratamento, com 15 explantes em cada), evidenciou diferenças após 30 dias de cultivo. O número de folhas foi maior nas plantas de N, já o número e o comprimento da raiz foram maiores nas plantas de S, assim como a massa seca, que foi em média três vezes maior nestas últimas. Adicionalmente, em 67% das plantas de N foram observados brotos laterais, o que não ocorreu nas plantas de S. Estas diferenças observadas entre o desenvolvimento e a morfologia das plantas obtidas destes explantes podem ter sido causadas por balanços hormonais divergentes e variações em reservas nutricionais, porém é necessário realizar futuras investigações para corroborar esta hipótese.

**Palavras-Chave:** Bromeliaceae, micropropagação, explante.

### INTRODUÇÃO

A técnica de micropropagação vem sendo utilizada como uma estratégia de preservação de espécies de bromélias ornamentais, pois fornece mudas de qualidade ao mercado, o que reduz a procura por indivíduos provenientes do ambiente natural, contribuindo para a diminuição do extrativismo ilegal (Rout *et al.* 2006).

Santos *et al.* (2010) estabeleceram um protocolo de micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch por meio da utilização de segmentos nodais como explantes, provenientes de plantas cultivadas *in vitro* a partir de sementes e que apresentavam eixo caulinar alongado. De cada segmento nodal mantido em meio nutritivo específico para essa espécie, selecionado por essas autoras, foi possível obter uma planta. Como é possível obter cerca de quatro segmentos nodais a partir de uma planta alongada, desenvolvida pelo meio de germinação das sementes, pode-se dizer que o uso dos segmentos nodais potencializa a produção de plantas desta espécie.

Portanto, esta espécie pode ser micropropagada a partir do uso de dois explantes – sementes e segmentos nodais. Protocolos de micropropagação de diversas espécies são, em sua maioria, elaborados a partir do uso de sementes para então se obter explantes alternativos, como os segmentos nodais (Bisognin *et al.* 2008, Silva *et al.* 2008). Os trabalhos sobre cultivo de plantas a partir de segmentos nodais têm como principal objetivo avaliar o potencial destes explantes para a obtenção de clones, pois originam plantas devido à quebra da dormência da gema lateral (Herter *et al.* 2001, Faquim *et al.* 2007). Não foram encontradas publicações que comparem as plantas provenientes de sementes àquelas obtidas por outros explantes, como os segmentos nodais. Deste modo, surge a dúvida se as plantas produzidas por sementes e segmentos nodais desta espécie apresentam características divergentes dentre elas ao serem cultivadas *in vitro*, alterando a produção de mudas e

não possibilitando a homogeneidade dos lotes de plantas produzidos.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu na identificação de diferenças e semelhanças entre a obtenção de plantas *in vitro* provenientes dos dois tipos de explantes utilizados na micropropagação da espécie (sementes e segmentos nodais isolados).

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material botânico*

Foram utilizadas sementes de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch, que se encontravam armazenadas a 10 °C no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica.

### *Obtenção dos segmentos nodais a partir de plantas alongadas in vitro*

Os segmentos nodais foram obtidos a partir do cultivo *in vitro* de plantas provenientes da germinação de 60 sementes submetidas à desinfestação superficial, conforme descrito por Santos *et al.* (2010). Foram utilizados frascos de vidro de 250 mL contendo 40 mL de meio de cultura de Murashige & Skoog (1962), com 1/5 dos macronutrientes da formulação original (MS/5), 2 % de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, pH de 5,8 e 5 g L<sup>-1</sup> de ágar. As sementes foram depositadas nesses frascos, que foram mantidos em sala de crescimento a 26 ± 2 °C, intensidade luminosa de 14 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 12 h durante dois meses, até que o eixo caulinar da planta evidenciasse quatro segmentos nodais em média, conforme estabelecido por Santos *et al.* (2010).

### *Comparação do crescimento de plantas a partir de sementes e segmentos nodais cultivados in vitro*

Oitenta segmentos nodais foram isolados, e transferidos para frascos de vidro de 250 mL com 40 mL de meio MS/5. Concomitantemente, 80 novas sementes foram desinfestadas e colocadas em frascos também com 40 mL de meio MS/5. Em cada frasco, foram adicionados cinco explantes. Os frascos com sementes (tratamento S) e segmentos nodais (tratamento N) foram mantidos em sala de cultura, nas condições descritas anteriormente. Ambos os tratamentos foram acompanhados diariamente de modo a identificar o momento em que a maioria das plântulas de S e as plantas de N atingissem um tamanho de parte aérea de no mínimo 1 cm, considerado normal para plantas de *A. strobilacea* (Pereira 1988). Ao atingir este tamanho

aproximado, 15 plantas obtidas de S e N foram utilizadas para análise biométrica que incluía a média do tamanho da maior folha e raiz entre as plantas de ambos os explantes. Em seguida, as plantas restantes dos dois tratamentos que atingiam esse tamanho foram transferidas para a câmara de crescimento de modo a prosseguir o crescimento *in vitro*.

Sessenta plantas provenientes de cada tratamento (S e N) foram transferidas para novos frascos de 500 mL com 100 mL de meio MS/5, sendo depositadas 15 plantas em cada um dos quatro frascos. Estes foram mantidos em câmara de crescimento ajustada para a temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, permanecendo nessas condições por mais 30 dias.

A cada 15 dias, durante o período de um mês foram realizadas coletas de 30 plantas provenientes de cada explante (S e N). Foi avaliado o número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF), quantidade de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), massas fresca e seca das partes aérea (MFPA, MSPA respectivamente) e radicular (MFPR, MSPR respectivamente), e a presença ou não de brotos laterais. Consideraram-se as folhas, raízes e brotos com tamanho maior ou igual a 0,5 cm.

### *Análise estatística*

Os valores referentes aos parâmetros descritos anteriormente foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho médio das plantas transferidas de ambos os explantes resultou em 1,9 cm de parte aérea e 1,7 cm de raiz em média. As plântulas de sementes levaram aproximadamente 15 dias para atingirem este tamanho após serem depositadas no meio nutritivo e mantidas em sala de cultura a 26 °C. Já as plantas oriundas dos segmentos nodais levaram aproximadamente 24 dias. A partir destes resultados, pode-se afirmar que o desenvolvimento inicial de plantas a partir de segmentos nodais ocorre de maneira mais lenta do que o desenvolvimento de plântulas oriundas de sementes. As reservas nutricionais presentes na semente, aliadas aos nutrientes do meio de cultura, podem ter contribuído para que o desenvolvimento da plântula ocorresse de maneira mais rápida do que as plantas de segmentos nodais. Observou-se também que a primeira estrutura a se desenvolver na semente foi a raiz, assim como relatado por Pereira (1988) para esta espécie. Entretanto, a primeira estrutura originada nas plantas provenientes do desenvolvimento da gema lateral contida no segmento nodal foi a parte aérea. Deve-se

considerar que o balanço entre auxinas e citocininas – responsável pela quebra de dormência da gema lateral presente no segmento nodal (Kerbauy 2008) – pode ter um efeito mais tardio do que o gerado pelo balanço hormonal dentre giberelinas e o ácido abscísico sobre a indução da germinação de sementes (Raven *et al.* 1996).

Os valores biométricos mostraram que, no geral, o número de folhas (tabela 1) e raízes (tabela 2) foi maior nas plantas de N, principalmente após 30 dias de cultivo. De modo oposto, as plantas obtidas de S mostraram os maiores valores para os parâmetros de comprimento da maior raiz (tabela 2) e de massa seca das partes aéreas e radicular (tabelas 1 e 2, respectivamente), também após os 30 dias de cultivo. Os parâmetros de comprimento da maior folha (tabela 1) e massa fresca da parte aérea e radicular (tabelas 1 e 2, respectivamente) não apresentaram resultados que possam indicar diferenças substanciais dentre as plantas obtidas dos dois explantes durante o período inicial do desenvolvimento.

Além dos parâmetros analisados anteriormente, foram verificadas diferenças entre a produção de brotos laterais nas plantas provenientes de ambos os explantes. Estes brotos foram observados apenas em plantas de N, as quais após 30 dias de cultivo a 25 °C, 67% dos exemplares apresentaram brotos laterais (figura 1A). Ao contrário destes resultados, nenhuma das plantas obtidas de S apresentou brotos laterais (figura 1B).

A formação de brotos laterais é regulada pela interação entre auxinas e citocininas, portanto, pode-se inferir que existe uma influência destes hormônios sobre as plantas de *A. strobilacea* originadas de sementes e segmentos nodais, porém com diferentes proporções. Os teores endógenos destes hormônios já foram quantificados durante o desenvolvimento de gemas laterais presentes em segmentos nodais isolados da bromélia *Ananas comosus*, por Souza *et al.* (2003). Estes autores verificaram que os teores de auxina reduziram significativamente no segmento nodal isolado durante as quatro primeiras horas de cultura *in vitro*, e que esta redução provavelmente favoreceu a biossíntese de citocininas, o que coincidiu com o início da divisão celular da folha. De maneira similar, Mercier & Endres (1999) observaram que plantas jovens de *Tillandsia recurvata* apresentaram um aumento no conteúdo de citocinina em relação à

auxina, o que foi relacionado ao desenvolvimento de novos brotos. Além disso, foi observado que quando estas plantas estavam na fase adulta, as taxas de auxina foram maiores que as de citocinina, o que foi justificado pela ausência de intensa organogênese nesta fase.

Entretanto, não foram encontrados relatos que comparem os teores endógenos destes e outros hormônios dentre o desenvolvimento de plantas de segmentos nodais e sementes, indicando a necessidade de se realizar novos estudos de maneira a esclarecer a hipótese de que estes hormônios agem de maneira distinta sobre estes explantes.

## CONCLUSÕES

As plantas de sementes e segmentos nodais apresentam diferenças em seu desenvolvimento inicial e em características morfológicas, que podem provir de influência hormonal e reservas nutricionais divergentes. Contudo, não foram observadas anormalidades entre essas plantas de modo a descartar a utilização de quaisquer uns desses explantes para a obtenção de mudas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bisognin, D. A., Silva, A. L. L., Horback, M. A., Giroto, J., Barriquello, C. J.** 2008. Germinação e propagação *in vitro* de porongo. *Ciência Rural*. 38 (2): 332-339.
- Faquim, R., Silva, I. D. & Carvalho, R. I. N.** 2007. Necessidade de frio para quebra de dormência de gemas de caquizeiro 'Fuyu'. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 29 (3): 438 - 444.
- Herter, F. G., Machado, L. B., Oliveira, M. F. & Silva, J.** 2001. Efeito do frio na brotação de gemas de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick, em Pelotas, RS. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23 (2): 261-264.
- Kerbauy, G. B.** 2008. *Fisiologia vegetal*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 431 p.
- Mercier, H., Endres, L.** 1999. Alteration of hormonal levels in a rootless epiphytic bromeliad in different phenological phases. *Journal of Plant Growth Regulation*. 18(3): 121-125.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Pereira, T.S.** 1988. Bromelioideae (Bromeliaceae): morfologia do desenvolvimento pós-seminal de algumas espécies. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. 29:115-154.
- Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E.** 1996. *Biologia Vegetal*. 5ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 728 p.
- Rout, G. R., Mohapatra, A. & Jain, S. M.** 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*. 24: 531-560.

Santos, D. S., Tamaki, V. & Nievola, C. C. 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 46: 524–529.

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

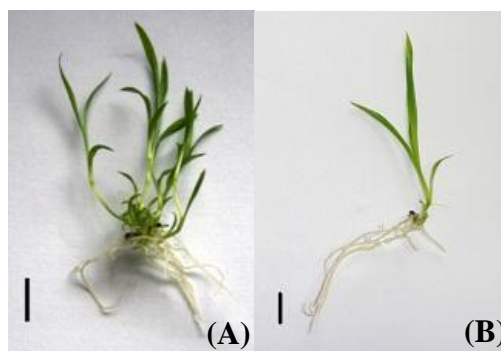
Souza, B.M., Kraus, J.E., Endres, L., Mercier, H. 2003. Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41 (8), pp. 733-739.

**Tabela 1.** Médias dos parâmetros biométricos da parte aérea das plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch provenientes de segmentos nodais e sementes, após 15 e 30 dias sob 25 °C em câmara de crescimento. Sendo: (T) temperatura; (N) segmento nodal; (S) semente; (NF) número de folhas; (CF) comprimento da maior folha; (MFPA) massa fresca da parte aérea; (MSPA) massa seca da parte aérea. Médias acompanhadas por letras distintas em ordem decrescente apresentadas na horizontal comparam os valores entre os parâmetros referentes à utilização dos dois explantes. Letras distintas indicam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância (n = 30). A comparação estatística é feita para cada bloco de tempo (aos 15 e aos 30 dias de experimento).

Período de cultivo	NF (un)		CF (cm)		MFPA (g)		MSPA (g)	
	N	S	N	S	N	S	N	S
15 dias	3,43A	2,83B	4,04B	5,36A	0,0609A	0,0664A	0,0041A	0,0040A
30 dias	5,27A	3,67B	6,90A	7,29A	0,1306A	0,1107A	0,0064B	0,0142A

**Tabela 2.** Médias dos parâmetros biométricos da parte radicular das plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch provenientes de segmentos nodais e sementes, após 15 e 30 dias sob 25 °C em câmara de crescimento. Sendo: (T) temperatura, (N) segmento nodal, (S) semente, (NR) número de raízes, (CR) comprimento da maior raiz, (MFPR) massa fresca da parte radicular, (MSPR) massa seca da parte radicular. Médias acompanhadas por letras distintas em ordem decrescente apresentadas na horizontal comparam os valores entre os parâmetros referentes à utilização dos dois explantes. Letras distintas indicam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância (n = 30). A comparação estatística é feita para cada bloco de tempo (aos 15 e aos 30 dias de experimento).

Período de cultivo	NR (un)		CR (cm)		MFPR (g)		MSPR (g)	
	N	S	N	S	N	S	N	S
15 dias	4,1A	3,97A	4,18B	5,12A	0,0100B	0,0332A	0,0018B	0,0033A
30 dias	5,87A	3,83B	5,17B	6,86A	0,0216A	0,0207A	0,0028B	0,0112A



**Figura 1.** Plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch após 30 dias sob 25 °C em câmara de crescimento obtidas de: (A) segmento nodal, evidenciando a presença de brotos laterais; (B) semente, sem a presença de brotos laterais. Barra = 1 cm.