

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS**



BÁRBARA PAULA DOS SANTOS BORGES

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Velloziasincorana* AYENSU & SMITH

Feira de Santana-BA
2015

BÁRBARA PAULA DOS SANTOS BORGES

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Velloziasincorana* AYENSU & SMITH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

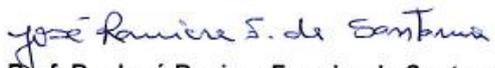
Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Feira de Santana-BA
2015

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Moema Cortizo Bellintani
(Universidade Federal da Bahia)


Prof.^a Dr.^a Aloné Lima Brito
(Universidade Estadual de Feira de Santana)


Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientador e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA
2015**

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

B73r Borges, Bárbara Paula dos Santos
 Regeneração *in vitro* de *Vellozia sincorana* Ayensu & Smith / Bárbara
Paula dos Santos Borges. – Feira de Santana, 2015.
 70 f. : il.

 Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2015.

 1. *Vellozia sincorana* – Propagação *in vitro*. 2. Candombá. I. Santana,
José Raniere Ferreira de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de
Santana. III. Título.

 CDU: 582.5

*A meus pais Antônio e Solange
A meu irmão (in memoriam) Roberto Sérgio*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a meus pais, Solange dos Santos Borges e Antônio Mario Santana Borges, pelo apoio em todos os momentos, carinho e constante incentivo para alcançar meus objetivos.

Ao meu bem, Gerson (Limão) pelo carinho, paciência e serenidade diante dos problemas.

Ao professor Dr. José Raniere Ferreira de Santana pela orientação.

A professora Dr.^a Alone Lima Brito pela paciência e atenção aos constantes questionamentos, auxiliando no meu crescimento profissional com sua competência admirável.

Aos colegas e amigos do LCTV pela agradável companhia ao longo desses dois anos e pelo apoio, seja para retirar as dúvidas e aflições do mestrado ou na execução dos trabalhos do dia-a-dia do laboratório.

Aos amigos que transferiram seu apoio e tornaram o caminho mais prazeroso, especialmente a Juliana, Lilian e Laisa.

A aluna de iniciação científica, Keise Barbosa, pela ajuda nos trabalhos laboratoriais. E é claro não poderia deixar de agradecer as gatinhas do LCTV-fest Emile, Jéssica, Flávia e Andressa que trouxeram para esse percurso mais leveza e alegria não só durante a execução dos trabalhos, mas no dia-a-dia fora do laboratório. Foi muito gratificante crescer pessoal e profissionalmente junto com vocês. Nesse reta final deixo um agradecimento especial a Andressita, pela ajuda e incentivo diante de todas as dificuldades.

A FAPESB pela concessão de bolsa.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção desse trabalho.

“O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis. “

José de Alencar

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Vellozia sincorana AYENSU & SMITH é endêmica dos Campos Rupestres da Chapada Diamantina, conhecida popularmente como Candombá. Essa espécie possui resina altamente inflamável, sendo o caule utilizado para acender fogões a lenha e as raízes para produzir incenso. O Candombá apresenta poucos trabalhos na literatura, não havendo estudos de propagação da espécie. Esse trabalho teve como objetivo desenvolver protocolo de multiplicação *in vitro* de *V. sincorana*, analisando o comportamento dos brotos *in vitro* submetidos ao estresse, e sua influência na multiplicação. Foram utilizados como explantes brotos obtidos *in vitro*, inoculados em concentrações de BAP (0,0; 2,22; 4,44 μM), CIN (0,0; 2,32; 4,64 μM) e AIB (0,0; 1,48 μM) em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 87,64 mM de sacarose, 1g.L^{-1} de carvão ativado, e 0,7% de ágar (meio básico). No experimento seguinte, testou-se concentrações das citocininas BAP ou CIN (0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 μM). Nos experimentos com estresse térmico, os brotos foram expostos a flambagem por diferentes períodos (0, 2, 4, 6, 8; 10 segundos), e no seguinte testou-se os períodos (0,0, 4,5, 6,0, 7,5; 9,0 min.) de exposição dos brotos a $105\pm 1^\circ\text{C}$, em estufa. Para estresse hídrico o meio básico foi suplementado com diferentes concentrações de ágar (7,0, 14,0, 21,0, 28,0g) e no experimento seguinte diversas concentrações de sacarose (87,64, 175,28, 262,92; 350,56 mM). O CIN apresentou maior eficácia na multiplicação, em relação ao BAP. As maiores médias para número de brotos e % explantes responsivos foram nos períodos 6, 8 e 10 segundos, sendo observada tolerância aos estresses hídrico e térmico.

Palavras Chaves: Candombá. Micropropagação. Reguladores vegetais. Estresse hídrico. Estresse térmico.

ABSTRACT

Vellozia sincorana Ayensu & SMITH is endemic of Rupestres Fields of Chapada Diamantina, popularly known as Candombá. This species has a highly flammable resin, and the stem used to ignite wood stoves and roots to produce incense. Candombá presents few studies in the literature, there are no studies of propagation of the species. This study aimed to develop *in vitro* multiplication protocol of *V. sincorana*, analyzing the behavior of *in vitro* shoots subjected to stress, and its influence on multiplication. They were used as explants *in vitro* shoots obtained, inoculated with concentrations of BAP (0.0; 2.22; 4.44 μM), CIN (0.0; 2.32; 4.64 μM) and IBA (0.0; 1.48 μM) in MS $\frac{1}{2}$ medium supplemented with 87.64 mM sucrose, 1g.L⁻¹ activated carbon, and 0.7% agar (basic medium). Subsequently, it tested concentrations of cytokinins BAP or KIN (0.0; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0 μM). In experiments with thermal stress, flame shoots were exposed for different periods (0.0; 2.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10 seconds), and the next tested whether the periods (0.0; 4.5; 6.0; 7.5; 9.0 min) exposure of the shoots 105 \pm 1 ° C in sterilize. For drought stress basic medium was agar supplemented with different concentrations (7.0; 14.0; 21.0; 28.0 g) and the following experiment different sucrose concentrations (87.64; 175.28; 262.92; 350.56 mM). The KIN showed greater efficacy in the multiplication in relation to BAP. The highest average for number of shoots and responsive% explants were in the periods 6, 8 or 10 seconds, being observed tolerance to water and thermal stress.

Key Words: Candombá. Micropropagation. Growth regulators. Water stress. water stress. Heat stress.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2Referências Bibliográficas.....	19
CAPITULO I -MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>V. sincorana</i>.....	23
1 Introdução.....	26
2 Material e Métodos.....	28
3 Resultados e Discussão.....	31
4 Conclusões	41
5 Referências Bibliográficas.....	42
CAPITULO II MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>V. sincorana</i> UTILIZANDO MECANISMOS DE ESTRESSE.....	45
1 Introdução.....	48
2 Material e Métodos.....	51
3 Resultados e Discussão.....	54
4 Conclusões.....	67
5 Referências Bibliográficas.....	68

1INTRODUÇÃO GERAL

A Chapada Diamantina está situada no centro da Bahia, apresentando vários tipos de vegetação que possuem grande diversidade, determinados pelas suas características fisiográficas. Esse mosaico de vegetação é frequentemente ameaçado pelos incêndios, os quais, segundo dados do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) são causados em 95% das vezes pela população, tornando-se mais grave no período seco da região (CONCEIÇÃO et al., 2005; JUNCÁ et al., 2005; NERI, 2008). Seus diversos biomas são classificados como extremamente desconhecidos pelo Ministério do Meio Ambiente, sendo uma área de grande interesse para a busca do conhecimento científico (MMA, 2002; CONCEIÇÃO, 2006).

Dentre os tipos de vegetação da Chapada Diamantina, o Campo Rupestre inserido nos biomas do Cerrado e da Caatinga é o mais característico dessa região, ocorrendo em altitudes acima de 900 metros. É composto primariamente por vegetação herbácea e arbustos perenes esclerófilos, sendo que grande parte das espécies vegetais são raras, tornando-as vulneráveis, seja pelo elevado número de endemismo tanto de gênero, quanto de espécie ou pela sua distribuição de forma espaça no ambiente, podendo estar presente em uma área, ausente ou pouco representada em outra (QUEIROZ et al., 1996; CONCEIÇÃO et al., 2005). Entre as famílias características dessa região encontram-se as Asteraceae, Orchidaceae, Eriocaulaceae, Xyridaceae e a Velloziaceae, sendo que as últimas citadas, tem esse ambiente como centro principal de distribuição (QUEIROZ, 2006).

A ocorrência de fogo nessa vegetação se apresenta como sua característica mais dinâmica, sendo um importante componente ecológico, de modo que espécies da região apresentam adaptações como sistemas subterrâneos, gemas protegidas pelas bainhas foliares e gemas aéreas protegidas por ramos grossos e folhas rosuladas, possibilitando a sobrevivência e renovação das espécies após uma queimada (NEVES; CONCEIÇÃO, 2010). Segundo Alves e Silva (2011) espécies de afloramentos rochosos, como as Velloziaceae, apresentam caules protegidos por espessas camadas de bainhas foliares, sendo as mesmas um eficiente isolamento térmico ao fogo rápido.

A família Velloziaceae possui cerca de 250 espécies de ervas e arbustos com distribuição na América do Sul e África (AYENSU; SMITH, 1976) dessas, 212 são

encontradas no Brasil (MELLO-SILVA, 2012). Segundo Ayensu e Smith (1976) algumas espécies desta família, apresentam potencial ornamental além de características farmacológicas importantes.



Figura 1 – Flores de *Vellozia sincorana* no Parque Nacional da Chapada Diamantina Fonte: Conceição; Orr 2012.

Vellozia sincorana AYENSU & SMITH (Velloziaceae), conhecida popularmente como Candombá, é uma espécie endêmica do Brasil que ocorre no Campo Rupestre da Chapada Diamantina, sendo característica dessa região. (AYENSU;SMITH, 1976; ALMEIDA, 2006). Pode chegar a 1m de altura com ramos espessos, sendo encontrada sobre afloramentos rochosos em geral, acima de 900 metros de altitude. A espécie apresenta folhas persistentes com formato triangular, possuindo geralmente coloração cinza-esbranquiçada devido a uma capa de cera que recobre sua superfície. Uma resina impregna a folha, após sua secagem, formando uma bainha espessa e resistente ao fogo em torno do caule e dos ramos (FUNCH et al., 2004).

Essa espécie possui uma ligação singular com o fogo, pois seu caule grosso e fibroso tem grande resistência às queimadas, além de produzir uma resina altamente inflamável, mesmo quando úmida, que favorece a propagação de incêndios (ALMEIDA, 2006). Além disso, o Candombá apresenta reprodução relacionada ao fogo, tendo em vista que a floração após uma queimada ocorre abundantemente (CONCEIÇÃO 2010; CONCEIÇÃO, 2012). De acordo com Ferri

(1979) muitos autores reportaram o efeito estimulador da queimada para a floração de espécies campestres. Segundo Meguro (1969) o fogo teria influência na eliminação de um possível inibidor localizado nas folhas, estimulando ao mesmo tempo a floração, seja por atuação da temperatura ou pelos gases de combustão.



Figura 2 - *Vellozia sincorana* após a passagem do fogo no Parque Nacional da Chapada Diamantina. Fonte: Conceição; Orr 2012.

As características peculiares do Candombá induzem seu extrativismo, sendo o caule utilizado pela população para acender fogões a lenha e as raízes na produção de incenso com a extração de sua resina (ALMEIDA, 2006). Sua propagação em ambiente natural, feita através de sementes torna-se ameaçada pela pressão de exploração para o uso da resina, principalmente com a retirada de suas raízes, o que pode levar a uma diminuição dessa espécie na natureza, prejudicando a estabilidade populacional da mesma.

Na literatura encontra-se um material ainda escasso sobre o Candombá, não havendo trabalhos de propagação da mesma, sendo encontradas pesquisas apenas na área ecológica Ayensu e Smith, (1976); Funch et al., (2004); Almeida, (2006); Conceição e Orr, (2012) e etnobotânica (OLIVEIRA, 2013). De modo que considerando a exploração local sofrida, urge o desenvolvimento de estudos para a propagação da espécie, visando sua conservação e exploração sustentável.

Dado o exposto, a cultura de tecidos surge como uma alternativa para a propagação da espécie, sendo uma das áreas biotecnológicas de grande sucesso que se baseia na totipotencialidade das células vegetais, ou seja, na capacidade de

produzir órgãos como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) no meio de cultivo favorável (CARVALHO; VIDAL, 2003). O cultivo *in vitro* apresenta diversas técnicas, dentre elas, a micropropagação uma das mais difundidas, possuindo várias vantagens em relação à propagação natural, como a obtenção de clones em larga escala em um pequeno espaço físico, rapidez e plantas livres de patógenos, (OLIVEIRA et al., 2007), sendo usada ainda em programas de melhoramento genético.

A micropropagação consiste nas etapas de estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização. Essas fases são interdependentes, de modo que o sucesso de uma influencia diretamente a seguinte. O estabelecimento *in vitro* é caracterizado pela escolha e desinfestação do explante, além da seleção do meio de cultura que juntamente com a origem do explante, podem determinar o sucesso da propagação *in vitro*. Diversas formulações do meio de cultura têm sido empregadas, podendo ser acrescido ao mesmo, carvão ativado que apresenta alto potencial de adsorção, modificando geralmente a composição do meio adsorvendo diversas substâncias tóxicas liberadas na autoclavagem ou pelos próprios explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O meio de cultivo é suplementado ainda por carboidratos, sendo utilizada amplamente a sacarose, que proporciona energia metabólica e esqueleto de carbono para a biossíntese de todos os compostos orgânicos essenciais para o crescimento das células (CALDAS et al., 1998). Além disso, a sacarose apresenta influência na regulação osmótica do meio de cultivo, podendo provocar, quando em concentrações acima de 4%, excessivo potencial osmótico (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Segundo Flores et al., (2013) esse osmorregulador, quando adicionado em alta concentração ao meio de cultivo, pode remover a água intracelular, através do gradiente osmótico, o que resulta em alterações no crescimento e nas respostas fisiológicas dos vegetais.

Outro componente adicionado ao meio de cultivo é o ágar, comumente utilizado para solidificar o meio, possuindo a característica de ser dissolúvel em água fervente e gelificado, quando em temperatura ambiente, sendo geralmente adicionado em concentrações que variam de 0,4% a 1% no meio de cultivo (CALDAS et al., 1998). De acordo com Leite (1993) e Rezende et al., (2008), alta concentração de ágar, pode provocar aumento do potencial osmótico do meio, o que

resulta em maior resistência a difusão de nutrientes para o explante, dificultando ainda a introdução do explante no meio de cultura (PAIVA et al., 1999).

A fase de multiplicação depende das características intrínsecas da espécie e do tipo de regulador de crescimento utilizado para suprir as possíveis deficiências hormonais nos explantes, sendo o tipo de citocinina e a sua concentração os fatores que mais influenciam nesse sucesso (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998; PASA et al., 2012). Dentre as citocininas, o BAP é geralmente a que mais apresenta resultados favoráveis, sendo utilizada em 68% dos meios, seguida pela cinetina 23% (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Outra classe de reguladores vegetais, as auxinas são acrescentadas ao meio de cultura com o intuito de estimular o desenvolvimento da parte aérea, em geral com sua concentração baixa quando comparada com as citocininas. O balanço hormonal entre as mesmas é importante, pois auxinas em concentrações excessivas podem estimular a produção de calos e favorecer o enraizamento prejudicando a produção de brotos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na etapa de enraizamento as características das raízes obtidas ao longo da multiplicação ou após essa fase, dependendo da espécie, apresenta influência direta no sucesso da fase final, a aclimatização, que deve ser feita de modo gradual para minimizar a perda das plântulas, estando envolvidos nesse processo fatores como o microambiente do tubo e a nutrição mineral (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; STANCATO; SILVEIRA, 2010).

O cultivo *in vitro* tem permitido muitos avanços na propagação de vegetais tornando-a mais eficiente e rápida, podendo ser considerada como uma importante ferramenta no estudo fisiológico e bioquímico de plantas, inclusive de espécies selvagens com pouco ou inexplorado potencial (CANÇADO et al., 2012). Além disso, tem sido utilizado frequentemente para entender o funcionamento das plantas em estresse suas respostas e capacidade de tolerância (CLEMENTE-PÉREZ; CADENAS-GOMÉZ, 2012).

A cultura de tecidos é utilizada como base para o melhoramento genético com a seleção *in vitro* de indivíduos resistentes ou tolerantes a estresses bióticos e abióticos, por meio de vantagens como condições controladas, meio de cultura com concentração determinada e exposição do material selecionado ao agente ou tipo de estresse de maneira isolada e protegida de contaminações com maior garantia de confiabilidade dos resultados (CANÇADO et al., 2009).

No ambiente natural os vegetais estão expostos tanto a estresses bióticos, quanto abióticos, os quais induzem uma modulação de respostas de defesa, buscando superá-los e recuperar seu metabolismo normal (SOARES et al., 2007). Embora, segundo Taiz e Zeiger (2009), o estresse possa ser definido como um fator externo, que influencia desvantajosamente a planta, para Hopkins (1999) as plantas podem responder ao estresse por diversos caminhos, em caso de estresse moderado de curto prazo, os prejuízos provocados podem ser resolvidos após ser interrompido, porém, estresse severos poderiam antecipar a floração e a formação de sementes, sendo essa estratégia utilizada como o mecanismo de defesa para perpetuar a espécie. Segundo o mesmo autor, algumas plantas apresentam tolerância ao estresse, possuindo mecanismos diferenciados que reduzem seu impacto, de modo que o organismo encontre equilíbrio com o ambiente interno e externo da planta.

O conceito de estresse de acordo com Taiz e Zeiger (2009) está intrinsecamente relacionado ao de tolerância, que se constitui na capacidade da planta em se adaptar a ambientes desfavoráveis. Para Niuet al., (2014) essa tolerância pode ser desenvolvida, quando há um controle da homeostase celular, função e estrutura das proteínas e membranas. Essa capacidade dos vegetais vem atraindo pesquisadores, com o intuito de selecionar plantas resistentes em programas de melhoramento genético na busca por espécies cada vez mais tolerantes (WARG et al., 2003), a estresses como estresse hídrico, altas temperatura, entre outros, visando avanços na agricultura.

De acordo com Sant'anna (2009) a compreensão e seleção dos mecanismos de resistência a seca são importantes para o desenvolvimento de novos cultivares tolerantes ao estresse hídrico. Esse tipo de estresse pode provocar nos vegetais, diminuição da área foliar, fechamento dos estômatos, limitação da fotossíntese, abscisão foliar, aprofundamento das raízes, entre outras estratégias para minimizar o efeito da redução hídrica (TAIZ; ZEIGER 2009). Segundo Chaves et al., (2002) as respostas da planta ao déficit hídrico são complexas envolvendo adaptações e/ou efeitos danosos, considerando que as estratégias para conviver com o mesmo, geralmente tendem a envolver tolerância variando de acordo com o genótipo.

O autor ressalta ainda que as diferenças entre as espécies vegetais nas estratégias para sobrevivência promovem capacidades ímpares de captura e

transporte de água, levando a diferenças drásticas no metabolismo. Essas modificações metabólicas podem provocar problemas na reprodução, de modo que é possível ser observada como estratégia a antecipação da fenologia, com a produção de flores e sementes antes que a água seja totalmente exaurida, ou outras podem resistir através do acúmulo de reservas que posteriormente serão direcionadas para a reprodução (CHAVES et al., 2002).

De acordo com Chavez et al.,(2002) o estresse hídrico, geralmente está inter-relacionado à tolerância e sensibilidade a outros estresses, como a alta temperatura. A temperatura é um dos mais críticos fatores que influenciam a distribuição do vegetal no ambiente físico, podendo afetar a fotossíntese, a estabilidade da membrana plasmática e sua estrutura celular (HOPKINS, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2009).

O estresse térmico segundo Wahid et al. (2007) é uma interligação complexa entre a intensidade da temperatura, a duração e o percentual no qual ocorre o aumento da mesma, sendo em geral, a tolerância determinada quando é possível a manutenção da produção e crescimento da planta sobre sua influência. A elevação da temperatura provoca a produção de uma classe única de proteínas conhecidas como proteínas do choque térmico (HSPs) que auxiliam as células a suportarem o estresse térmico (TAIZ; ZEIGER, 2009). Elas atuam como chaperonas moleculares, sendo responsáveis pelo dobramento correto de proteínas maldobradas e agregadas, para evitar a deformação das mesmas, o que possibilita um funcionamento adequado da célula submetida a temperatura elevada (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Segundo Niu et al., (2014), a habilidade da planta para suportar temperatura extrema poderia estar relacionada com a capacidade para o desenvolvimento da aclimatação ou adaptação de cada espécie. Um exemplo de adaptação ao estresse térmico são as plantas que possuem uma intrínseca relação com o fogo, devido a ocorrência de queimadas em seu ambiente natural. Essas espécies são chamadas de pirofíticas, apresentando estratégias para rebrotar e florescer, após o fogo.

Desse modo esse trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de multiplicação *in vitro* para a *V. sincorana*, analisando o comportamento das microplantas *in vitro* quando expostas a reguladores vegetais e ao estresse, tendo em vista a proteção de seu germoplasma *ex situ* e sua exploração sustentável.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.O.; Aprendizagem sobre o candombá... e sobre as relações entre sujeitos...e entre sujeitos e candombás. **Candombá**, v.2, n.1, p 37-49, 2006.

ALVES, R.J.V.; SILVA, N.G. **O Fogo é Sempre um Vilão nos Campos Rupestres?**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Biodiversidade Brasileira, n.2, p.120-127, 2011.

AYENSU, E.S.; SMITH, L.B. A Revision of American Velloziaceae.**SmithsonianInstituion Press**. Washington, 1976.

CARVALHO, F.M.J.; VIDAL, S.M. **Noções básicas de cultura de tecidos**. Documentos 116. Embrapa, Outubro, 2003.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. *In*: TORRES. A.C.; CALDAS. L.S.; BUSO. J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA v.1,1998. 864p.

CANÇADO, A.M.G.; RIBEIRO, P.M.; FREITAS, F.G.; SÁ, L.E.M.; SILVA, E.H.;PASQUAL, M.; VAL, B.D.A.; NUNES, F.C. Cultivo *in vitro* de plantas e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, v.30, n.253, p.64-74, 2009.

CANÇADO, A.M.G.; BRAGA, T.F.; SOUZA, V.A.R.; NUNES, F.C.; RIBEIRO, P.A.; SOARES, F.D.B. Cultivo *in vitro* da oliveira e suas aplicações. *In*. OLIVEIRA, A.F.de. (Org). **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012,772p.

CHAVEZ, M.M.; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M.L.; RICARDO. C.P.P.; OSÓRIO, M.L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the Field. Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v.89n.7, p.907-916, 2002.

CLEMENTE – PÉREZ, M.R.; CADENAS - GOMÉZ, A.; *In vitro* Tissue Culture, a Tool for the Study and Breeding of Plants Subjected to Abiotic Stress Conditions, **Recent Advances in Plant *in vitro* Culture**. In Tech, p. 92-108, 2012.

CONCEIÇÃO, A. et al. Campo Rupestre. *In*. JUNCA, F.; FUNCH, J.L.; ROCHA, W. (Org). **Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina**. Brasília, DF, Ministério do Meio Ambiente, Serie Biodiversidade 13, 2005,411p.

CONCEIÇÃO, A. Ecologia da vegetação dos Campos Rupestres na Chapada Diamantina. *In*. QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semiárido brasileiro**.Brasília, DF, Brasil, 2006.

CONCEIÇÃO, A.Entrevista com Abel Conceição sobre fogo. **Grupo Contrafilé** Janeiro, 2010.

CONCEIÇÃO, A.; ORR, B.J. Post-fire flowering and fruiting in the endemic caulescent rosette *Velloziasincorana* (monocotyledonous) inflammable plant. **Acta Botânica Brasilica**. v.26, n.1, p.94-100, 2012.

FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**, São Paulo, Ed. Da Universidade de São Paulo, 1979, 392p.

FLORES, R.; ULIANA, S.C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T.M.B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v.4, n.3, p.192-199, 2013.

FUNCH, L.S.; HARLEY, R.; FUNCH, R.; GIULIETTI, A.M.; MELO, E. **Plantas úteis da Chapada Diamantina**. São Carlos: RIMA, 2004, 206p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA v.1, 1998. 864p.

HOPKINS, G.W. **Introduction to plant physiology**. 2° ed., New York City, Published by John Wiley & Sons, Inc., 1999.

JUNCA, F.A.; FUNCH, L.; ROCHA, W. **Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina**. Ministério do meio ambiente. Brasília, DF, 2005.

LEITE, D.L.; PETERS, J.A.; NAKASU, B.H.D. Efeito de solidificantes sobre a multiplicação e crescimento de gemas de Pereira. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.5, v.1, p.47-49, 1993.

MMA, (Ministério do Meio Ambiente). **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Secretaria da Biodiversidade e Florestas (SBF), Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2002.

MEGURO, N. Fatores que regulam a floração em *Imperata brasiliensis* Trim. (Gramineae), **Botânica**, v.24, p.103-125, 1969.

MELLO-SILVA, R. Velloziaceae. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012.

NERI, M. **Inimigo número 1, fogo espalha rastro de destruição no Parque Nacional Chapada Diamantina**. Disponível em: <http://pib.socioambiental.org/c/noticias?id=61550&startMonth=01&startYear=1989&endDay=2&endMonth=08&pageID=1>> Acesso em: 10/09/2014

NEVES, S.P.S.; CONCEIÇÃO, A.A.C. Campo rupestre recém-queimado Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. **Acta Botânica Brasilica**. v.24, n.3 p.697-707, 2010.

NIU, S.; LUO, Y.; LI, D.; CAO, S.; XIA, J.; LI, J.; SMITH, D.M. Plant growth and mortality under climatic extremes: An overview. **Environmental and Experimental Botany**. v.98, p.13-19, 2014.

OLIVEIRA, M.F.F.; SILVA, B.M.K.; OLIVEIRA, F.G.; DANTAS, M.I.; CAMACHO, V.G.R. Micropropagação de mimosa *Caesalpiniaefolia*Benth. a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.152-159, 2007.

OLIVEIRA, R.C.S. **Uso e conservação do candombá (*Velloziasincorana*), planta endêmica da Chapada Diamantina**. 2013, 86p., Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana,BA.

PASA, M.S. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta'Xavante'. **Ciência Rural**, v.42, n.8, p.1392-1396, 2012.

PAIVA, P.D.O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação *in vitro* de Crisântemo. **Revista Ceres**, v.46, n.264, p.141-148, 1999.

QUEIROZ, P.L.; SENA, N.S.T.; COSTA, L.S.J.M. Flora vascular da Serra da Jibóia, Santa Terezinha-Bahia.I: O Campo Rupestre. **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, v.15, n.1,p. 27-40, 1996.

QUEIROZ, L.P. Angiospermas do Semiárido Brasileiro. *In*. QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro**. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília, Brasil, 2006.

REZENDE, J.C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S.P.; PEREIRA, A.R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentrações de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v.9, n.1, p.21-26, 2005.

SANT'ANNA, H.L.S.; **Aspectos fisiológicos de variedades de citros submetidas à deficiência hídrica progressiva**. 2009, 84p. Dissertação (Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.

STANCATO, G.C; SILVEIRA, A.P.D. Micorrização e adubação de mudas micropropagadas de antúrio, cv. eidibel: crescimento e aclimatização *ex vitro*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p957-963, 2010.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p. 9, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5° Ed. Porto Alegre. 2009, 819p.

WARG, W.; VINORCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1 p. 1-14, 2003.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAFA, M.; FOOLAD.; M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v.61, p.199-223, 2007.

CAPITULO I

Multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana* AYENSU & SMITH

RESUMO

Vellozia sincorana AYENSU & SMITH é endêmica dos Campos Rupestres da Chapada Diamantina, sendo conhecida popularmente como Candombá. Essa espécie possui uma resina altamente inflamável, o que induz uma exploração puramente extrativista pela população local, que utiliza o caule para acender fogões a lenha e as raízes para a produção de incenso. O candombá possui poucos estudos na literatura, não havendo trabalhos de propagação para a espécie. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de *V. sincorana*. Nesse intuito foram utilizados como explante brotos obtidos *in vitro*. Os explantes foram inoculados em diferentes concentrações dos reguladores vegetais BAP (0,0; 2,22; 4,44 μM), CIN (0,0; 2,32; 4,64 μM) e AIB (0,0; 1,48 μM) em meio MS com metade das concentrações salinas suplementado com 87,64mM de sacarose e 1g.L^{-1} de carvão ativado, e solidificado com 0,7% de ágar. No experimento seguinte, testou-se diferentes concentrações das citocininas BAP ou CIN (0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 μM) na indução de brotos. O CIN apresentou maior eficácia na multiplicação quando comparada com o BAP, porém as concentrações de reguladores testadas não foram eficientes para produção de uma taxa satisfatória de brotos.

Palavras-chaves: Candombá. Reguladores vegetais. Micropropagação.

ABSTRACT

Vellozia sincorana AYENSU & SMITH is endemic of Rupestres fields of Chapada Diamantina, being popularly known as Candombá. This species has a highly flammable resin, which induces a purely extractive exploitation of the local population, using the stem to ignite wood stoves and roots for the production of incense. The candombá has few studies, there is no propagation of work for the species. This study aimed develop a multiplication protocol *in vitro* *V. sincorana*. To that end were used as explants shoots obtained *in vitro*. The explants were inoculated in different concentrations of growth regulators BAP (0.0; 2.22; 4.44 μM), CIN (0.0; 2.32; 4.64 μM) and AIB (0.0; 1.48 μM) in MS with half the salt concentrations supplemented with 87.64mM sucrose, 1g.L^{-1} of activated carbon and solidified with 0.7% de Agar. In the following experiment, we tested different concentrations of cytokinin BAP or CIN (0.0; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0 μM) in the induction of shoots. The KIN showed greater efficacy in the multiplication compared with BAP, but the growth regulator concentrations tested were not effective in producing a satisfactory rate of shoots.

Key Words: Candombá. Growth regulators. micropropagation.

1 INTRODUÇÃO

Vellozia sincorana AYENSU & SMITH conhecida popularmente como Candombá, pertence a família Velloziaceae sendo restrita aos Campos Rupestres da Chapada Diamantina. Essa espécie possui uma resina altamente inflamável o que induz o extrativismo da mesma, sendo o caule utilizado pela população local para acender fogões a lenha e as raízes para a produção de incenso com a extração de sua resina (ALMEIDA, 2006). Além disso, a biomassa da espécie foi testada, sendo utilizada como combustível de ignição, em trabalhos com a Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.), apresentando bons resultados para a combustão dos gases advindos da gaseificação (ALMEIDA, 2006; OLIVEIRA, 2008).

O Candombá, embora possua alta densidade populacional, apresenta baixa distribuição, sua reprodução é favorecida pelo fogo, pois após a queimada sua floração ocorre abundantemente (CONCEIÇÃO, 2010). Suas características peculiares combinadas com a exploração puramente extrativista dos caules e raízes tornam urgentes medidas para expandir o conhecimento sobre a espécie que ainda é pouco estudada, sendo citada apenas por Ayensu e Smith (1976), Almeida (2006), Funch et al. (2004), Oliveira (2008), Conceição e Orr (2012), e Oliveira (2013) em trabalhos de taxonomia, ecologia e etnobotânica; não havendo relatos na literatura sobre sua propagação e conservação.

A cultura de tecidos é um instrumento da biotecnologia que possibilita, através da micropropagação, alta produtividade, apresentando várias vantagens em relação a propagação natural, tais como: obtenção de clones em larga escala, rapidez e plantas livres de patógenos; servindo ainda como ferramenta para programas de melhoramento, pesquisa em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários (CARVALHO; VIDAL, 2003). A micropropagação consiste das fases de estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização, as quais são interdependentes.

A fase de multiplicação visa a produção acentuada de plantas em curto espaço de tempo, manipulando as condições de cultivo e a composição do meio de cultura; sendo em geral utilizados reguladores vegetais para suprir eventuais deficiências nos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A formação de brotos *in vitro* é influenciada pela aplicação de reguladores vegetais, sendo importante o balanço entre duas classes, auxinas e citocininas

(TAIZ; ZEIGER, 2009). A citocinina BAP (6-benzilaminopurina), seguida de CIN (cinetina) e as auxinas ANA (ácido naftaleno acético) e AIB (ácido indol-3-butírico) são as mais freqüentemente utilizadas na propagação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A estrutura vegetal organizada em parte aérea, raízes e suas ramificações são dependentes do transporte polar de auxina, no sentido ápice-base, sendo o ápice caulinar a fonte principal desse hormônio, suprimindo assim, o desenvolvimento das gemas laterais. Em contraste, a citocinina estimula a divisão celular e o brotamento quando aplicada em diversas espécies, podendo as mesmas ser densamente ramificadas, quando em contato com altas concentrações de citocininas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As citocininas podem estimular ou inibir vários processos fisiológicos, bioquímicos e a produção de metabólitos nos vegetais; e embora o estímulo das mesmas à proliferação celular tenha sido sua ação descoberta inicialmente; essas substâncias têm influência no desenvolvimento vascular, senescência foliar e dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Dado ao exposto, esse trabalho teve como objetivo testar reguladores vegetais na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*, visando o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

2.2 Material Vegetal

As sementes foram coletadas na Serra do Candombá, na Chapada Diamantina (BA) e armazenadas em sacos de papel sob a temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ em geladeira no LCTV.

2.3 Condições de Cultivo

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os experimentos foram realizados utilizando tubos de ensaio (25x150mm), contendo 10 ml de meio de cultura com os mesmos sendo vedados com Policloreto de Vinila (PVC).

2.4 Estabelecimento *in vitro* de *Vellozia sincorana*

As sementes permaneceram em água corrente por 30 minutos; foram desinfestadas em álcool 70% (1min) seguido de hipoclorito de sódio a 2,5% mais uma gota de detergente (10min), sendo posteriormente lavadas em água destilada estéril por três vezes. A semeadura foi feita em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas (MS $\frac{1}{2}$) suplementado com 87,64mM de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e acrescido de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carvão ativado (meio básico). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 1$ e o meio foi autoclavado à temperatura de 121°C por 15 minutos (BORGES, 2013).

Plantas estabelecidas *in vitro* foram cultivadas por 2 anos, sendo transferidas para meio com a mesma composição, a cada 6 meses. Os brotos emitidos das plantas foram cultivados em meio básico para a execução dos experimentos de multiplicação.

2.5 Multiplicação *in vitro*

2.5.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina), CIN (cinetina) e AIB (ácido indol-3-butírico) na multiplicação *in vitro* de *V. sincorana*.

Microplantas com 50 dias de cultivo foram inoculadas em meio básico composto por diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,22; 4,44 μ M), CIN (0,0; 2,32; 4,64 μ M) e AIB (0,0; 1,48 μ M). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três concentrações de BAP e três concentrações de CIN, totalizando nove tratamentos compostos por cinco repetições, cada uma com quatro tubos. Em todos os tratamentos, exceto o controle, foram aplicados 1,48 μ M de AIB.

Tabela 1- Disposição dos tratamentos para multiplicação de *V. sincorana* nas diferentes concentrações de BAP, CIN e AIB.

TRAT.	BAP	CIN	AIB	
1	0,0	0,0	0,0	2.5
2	0,0	2,32	1,48	.2E
3	0,0	4,64	1,48	feit
4	2,22	0,0	1,48	o
5	2,22	2,32	1,48	de
6	2,22	4,64	1,48	dif
7	4,44	0,0	1,48	ere
8	4,44	2,32	1,48	nte
9	4,44	4,64	1,48	s

concentrações das citocininas BAP (6-benzilaminopurina) ou CIN (cinetina) na multiplicação *in vitro* de *V. sincorana*.

Microplantas com 15 dias de cultivo foram inoculadas em meio básico composto por diferentes concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 μ M) de BAP ou CIN. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 5 (2 tipos de citocininas x 5 concentrações) totalizando 10 tratamentos constituídos por cinco repetições, cada uma composta por quatro tubos.

2.6 Variáveis e Análise estatística

Após 65 dias de montagem dos experimentos de multiplicação avaliou-se o número de brotos por explante, porcentagem de explantes responsivos, número de folhas, comprimento da parte aérea, matéria fresca e seca da parte aérea, matéria fresca e seca da raiz, número de raízes e comprimento da maior raiz.

Os dados foram avaliados, mediante a análise de variância, sendo transformados pela função $(x+1)^{1/2}$. As médias foram analisadas pelo teste Scott-Knotte o programa utilizado foi o SISVAR, v 5.3, desenvolvido pela UFLA (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento

A *Vellozia sincorana* apresentou alto índice de germinação com 100% de resposta no meio MS ½ após 10 dias de inoculação.

3.1.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP, CIN e AIB na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

Não se observou diferenças significativas na fonte de variação tratamento para as variáveis número de brotos por explante (NB), folhas (NF) e raízes (NR), porcentagem de explantes responsivos (%ER), matéria fresca (MFPA) e seca da parte aérea (MSPA), matéria seca das raízes (MSR), sendo significativa ($p < 0,05$) as variáveis comprimento da parte aérea (CPA), matéria fresca da raiz (MFR) e comprimento da maior raiz (CMR) (Tabela 2).

Para a variável comprimento da parte aérea, os tratamentos 4 (2,22 de BAP, 0,0 de CIN), 5 (2,22 de BAP, 2,32 de CIN) e 9 (4,44 de BAP e 4,64 de CIN) todos contendo 1,48 de AIB não apresentaram diferença estatística em relação ao tratamento 1 (controle) (Tabela 3); os demais tratamentos testados apresentaram médias inferiores ao controle. Estes resultados diferem do observado por Freitas Neto (2009) em trabalhos com *Vellozia flavicans* que constatou maior comprimento dos brotos com a combinação dos três reguladores citados acima. Já Monfort et al. (2012) constataram, em trabalhos com *Ocimum selloi*, uma diminuição no comprimento das brotações com a adição de BAP no meio de cultura, sendo sua maior média observada na ausência desse regulador, com decréscimo expressivo, após a concentração de 2 μ M.

Em relação ao comprimento da maior raiz, de modo similar não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos 2 (0,0 de BAP e 2,32 de CIN), 5 (2,22 de BAP e 2,32 de CIN), 7 (4,44 de BAP e 0,0 de CIN) e 9 (4,44 de BAP e 4,64 de CIN) (Tabela 3) todos contendo 1,48 de AIB os quais foram significativamente superiores aos demais tratamentos testados.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para número de brotos por explantes (NB), número de folhas (NF), número de raízes (NR), % explante responsivos (%ER), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria fresca (MFR) e seca da raiz (MSR) de *V. sincorana* submetida a diferentes tratamentos com BAP, CIN e AIB.

FV	GL	Quadrados Médios									
		NB	NF	NR	%ER	CPA	CMR	MFPA	MSPA	MFR	MSR
Trat.	8	0,0094 ^{ns}	0,0525 ^{ns}	0,0315 ^{ns}	5,3397 ^{ns}	0,6076*	2,1341*	0,1729 ^{ns}	0,0280 ^{ns}	0,0519*	0,0016 ^{ns}
Resí.	36	0,0141	0,0518	0,0325	4,0108	0,2446	0,8710	0,1809	0,0208	0,0219	0,0008
CV%		11,22	7,91	10,16	88,03	5,83	13,65	12,70	26,54	8,56	2,72

^{ns}. Não significativo; * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Dados transformados $(x+1)^{1/2}$

Os dados observados corroboram Silveira (2009) que constatou maior comprimento dessa variável, em estudos com *Neoglaziovia variegata*, na ausência de CIN. Para a matéria fresca da raiz obteve-se comportamento semelhante, não havendo diferença estatística entre o controle e os tratamentos 2, 5 e 7 (Tabela 3). Esse resultado discorda de Silva et al. (2003), em trabalhos com *Sinningia speciosa*, os quais obtiveram maiores médias no tratamento controle com diminuição da mesma na presença de BAP.

Tabela 3 – Comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz e matéria fresca da raiz de

TRAT.	BAP	CIN	AIB	CPA (mm)	CMR (mm)	MFR (mg)
1	0,0	0,0	0,0	74,05 a	50,64 a	1,71 a
2	0,0	2,32	1,48	65,89 b	49,21 a	1,59 a
3	0,0	4,64	1,48	68,62 b	34,41 b	1,14 b
4	2,22	0,0	1,48	75,38 a	39,49 b	1,15 b
5	2,22	2,32	1,48	81,37 a	55,07 a	1,96 a
6	2,22	4,64	1,48	68,06 b	40,28 b	1,10 b
7	4,44	0,0	1,48	62,15 b	61,94 a	1,51 a
8	4,44	2,32	1,48	70,92 b	39,81 b	1,00 b
9	4,44	4,64	1,48	75,86 a	50,76 a	1,32 b

brotos de *V. sincorana*, submetida a diferentes tratamentos com os reguladores BAP, CIN e AIB.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste Scott-Knott.

Os dados observados para a espécie em estudo sugerem que a utilização dos reguladores vegetais BAP, CIN e AIB nas concentrações testadas não favoreceram a emissão de brotos. Sendo indicado o teste de outras concentrações e tipos de reguladores vegetais. Esses resultados tornam evidente a necessidade de investigação e desenvolvimento de protocolos específicos de cultivo *in vitro* para cada espécie, tendo em vista que as mesmas concentrações e combinações de reguladores foram testadas por Freitas Neto (2009) apresentando resposta positiva para a emissão de brotos (7,2) na espécie do mesmo gênero, *Vellozia flavicans*.

3.1.2 Efeito de diferentes concentrações da BAP ou CIN na multiplicação *in vitro* de *V. sincorana*.

De acordo com a análise de variância a interação entre as fontes de variações Citocinina X Concentração foi significativa ($p < 0,05$) para matéria fresca da parte aérea (MFPA) e altamente significativa ($p < 0,01$) para comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento da maior raiz (CMR) (Tabela 4). A fonte de variação Citocinina mostrou-se significativa ($p < 0,05$) para número de brotos (NB), porcentagem de explantes responsivos (%ER) e matéria fresca da raiz (MFR) e altamente significativa ($p < 0,01$) para número de folhas (NF), matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca da raiz (MSR). Na fonte de variação Concentração do regulador observou-se resultado significativo ($p < 0,05$) para a variável número de folhas (NF) e porcentagem de explantes responsivos (%ER).

Para a variável número de brotos a maior média (0,30) foi obtida com a utilização da cinetina no meio de cultura (Figura 3A). Resultado oposto foi observado por Freitas Neto (2009) que obteve maior emissão de brotos (7,2) com adição de BAPem comparação com o CIN, trabalhando com *V. flavicans*. Da mesma forma, Carvalho et al. (2009) e Abdi et al. (2013) observaram resultados contrários aos obtidos para a espécie em estudo, com resposta satisfatória para número de brotos utilizando BAP, no cultivo *in vitro* de *Ananas comosuse Aloe vera*, respectivamente

Para a porcentagem de explantes responsivos, obteve-se valor superior (21%) com a adição da cinetina no meio de cultivo, diferindo significativamente da citocinina BAP que apresentou uma média de 8% (Figura 3B). Essa maior responsividade dos explantes pode ser observada na figura 4, na qual observa-se uma maior quantidade de brotos nos tratamentos que foram adicionados o CIN quando comparado com os tratamentos com adição de BAP. Os resultados obtidos para a espécie em estudo discordam de Jayakrishna et al. (2011), que em trabalhos com *Aloe barbadensis*, observaram maior valor de responsividade com a adição da citocinina BAP ao meio de cultura.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF) e comprimento da parte aérea (CPA), porcentagem de explante responsivos (%ER), matéria fresca (MFPA) e seca da parte aérea (MSPA), matéria fresca (MFR) e seca da raiz (MSR), número de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (CMR) de *V. sincorana* submetidos a diferentes concentrações das citocininas BAP ou CIN.

FV	GL	Quadrados Médios									
		NB	NF	CPA	%ER	MFPA	MSPA	MFR	MSR	NR	CMR
Citocinina	1	0,0706*	1,1914**	2,1832**	36,2140**	0,0019**	0,0000**	0,0000*	0,0000**	0,1464 ^{ns}	2,6965**
Concentra.	4	0,0334 ^{ns}	0,2948 ^{ns}	0,6693**	13,7346*	0,0002*	0,0000 ^{ns}	0,0000 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,1674 ^{ns}	0,9195*
CitoxConc	4	0,0396 ^{ns}	0,1043 ^{ns}	1,1991**	7,3634 ^{ns}	0,0003*	0,0000 ^{ns}	0,0000 ^{ns}	0,0000 ^{ns}	0,1196 ^{ns}	2,1631**
Resíduo	40	0,0154	0,0948	0,1504	4,4982	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0752 ^{ns}	0,3253
CV%		11,37	8,29	6,34	70,74	11,13	8,49	10,52	3,07	13,52	8,40

^{ns}Não significativo; *significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; **significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Dados transformados $(x+1)^{1/2}$.

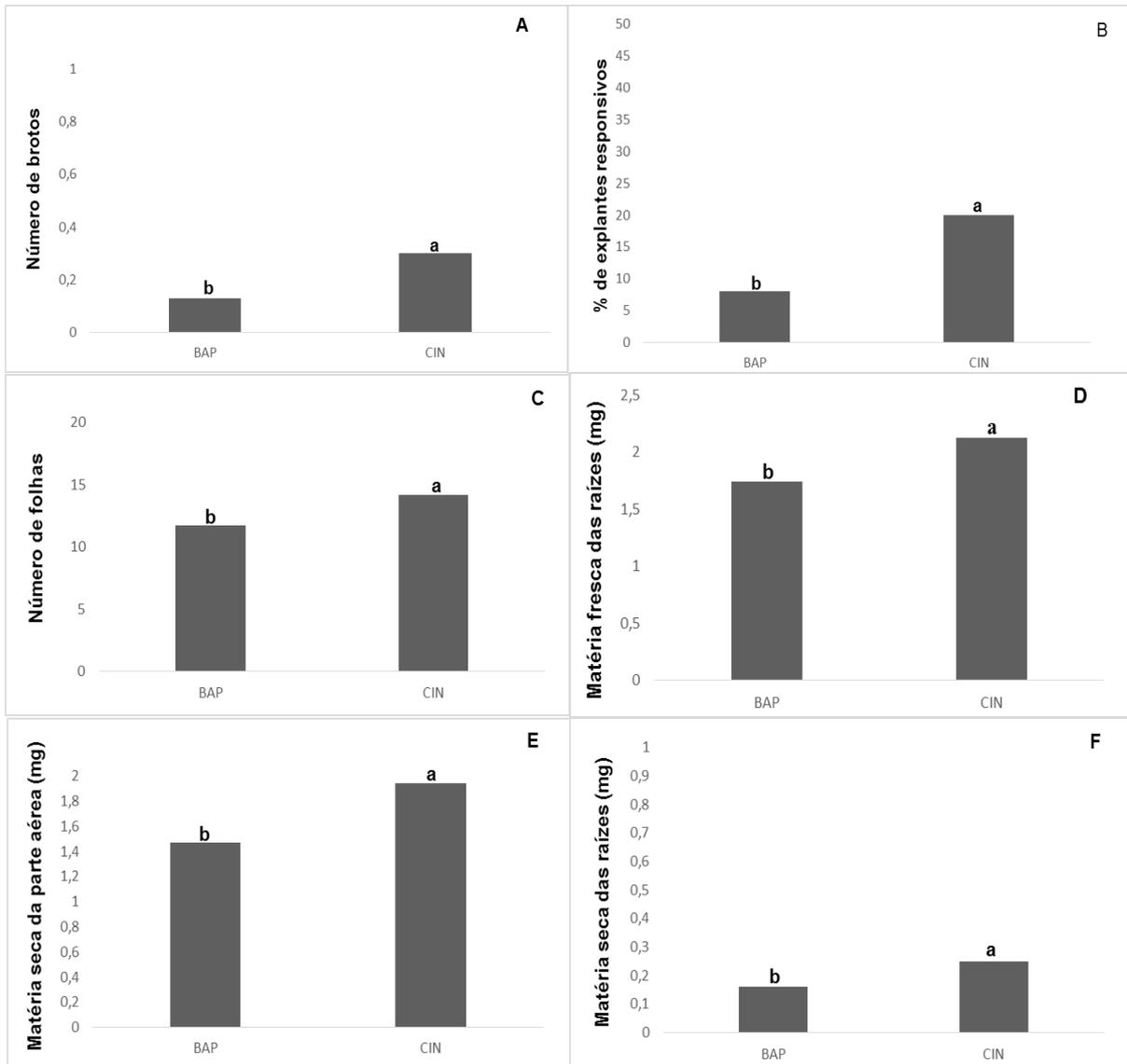


Figura 3 - Número de brotos (A), % explantes responsivos (B), número de folhas (C), matéria fresca das raízes (D), matéria seca da parte aérea (E) e matéria seca das raízes (F) de *V. sincorana* submetidas a diferentes citocininas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste Scott-Knott.

Embora na maioria dos estudos de micropropagação *in vitro* a citocinina BAP apresente melhor resposta para indução de brotos (Abdi et al., 2013), os resultados obtidos indicam a CIN como mais favorável a emissão de brotos para a espécie em estudo.

Considerando o número de folhas, de modo similar as variáveis anteriores, observou-se influência do tipo de citocinina, apresentando média superior com a utilização da CIN no meio de cultura (Figura 3C). Os dados obtidos discordam

Dwivedi et al. (2014) que em estudo com *Aloe vera* obtiveram médias superiores para número de folhas com a utilização da citocinina BAP.

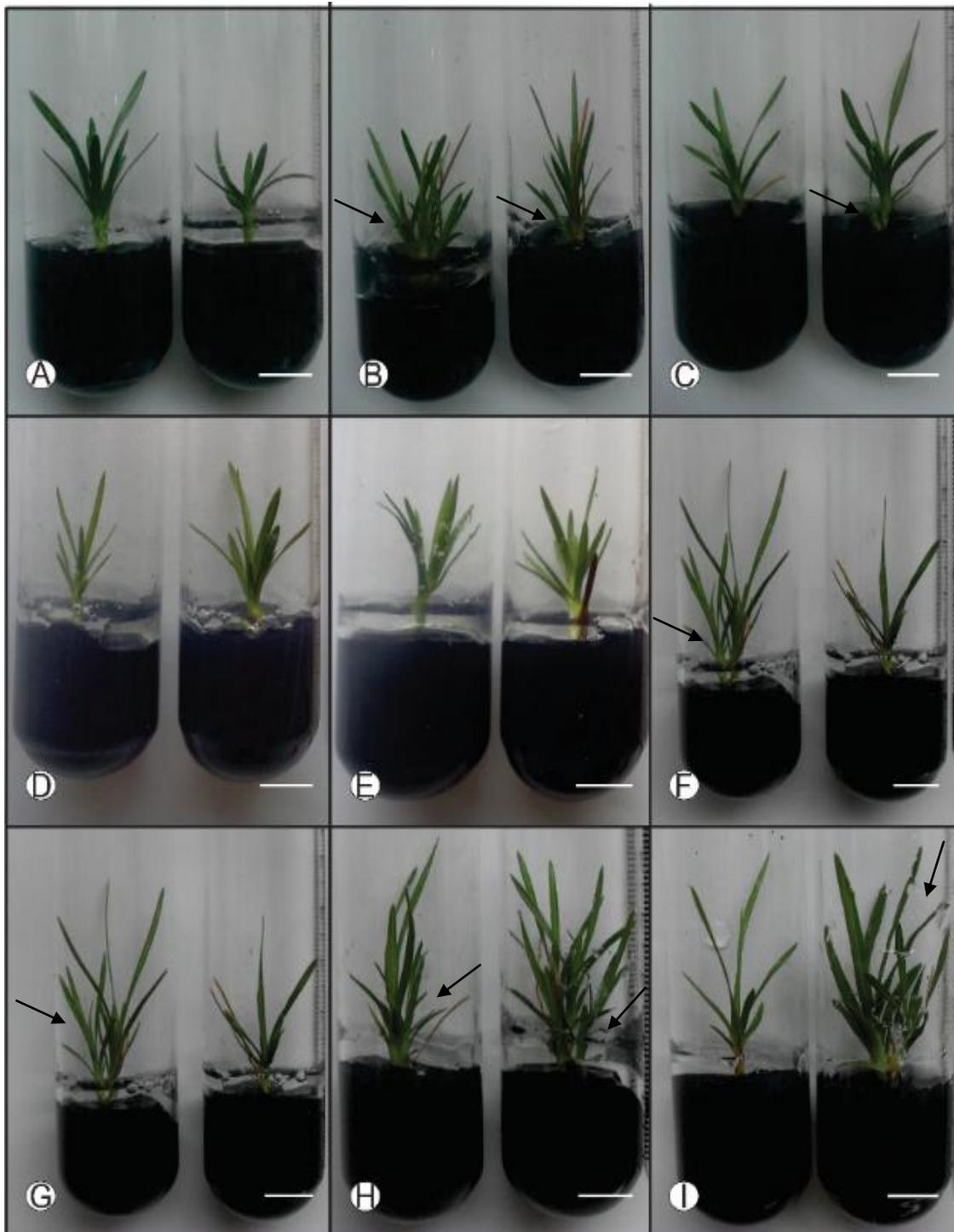


Figura 4 – Brotos de *V. sincorana* submetidos a diferentes concentrações de BAP ou CIN (A (0,0) B, C, D e E (5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μ M de BAP) F, G, H e I (5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μ M de CIN). Escala 1cm.

De acordo com Bandinelli et al. (2013) o aumento no número de folhas, está inter-relacionado ao maior número de entrenós, ou seja, maior número de gemas, sendo portanto sua elevação uma resposta positiva para indução de brotos, visto

que, segundo Costa et al. (2010) entre o caule e a inserção da folha há produção de gema, podendo a mesma originar um broto, possibilitando assim incremento da taxa multiplicativa. Essa relação positiva pôde ser observada no presente trabalho, pois as maiores médias para número de folhas foram obtidas nos tratamentos acrescidos da cinetina, de modo similar ao observado para número de brotos.

Para matéria fresca e seca da raiz, observou-se influência do tipo de citocinina, obtendo-se as maiores médias (2,13 e 0,25 respectivamente) com a adição da cinetina (Figura 3D e 3F). Os dados obtidos discordam de Silva (2010) que em trabalhos com *Aechmea blanchetiana*, observou resposta superior para matéria fresca da raiz, na ausência de citocininas. O mesmo autor observou ainda resultado oposto ao da espécie em estudo, para matéria seca da raiz, obtendo médias semelhantes entre os tratamentos com adição de citocininas e o tratamento controle.

De modo similar, obteve-se resposta favorável nos tratamentos suplementados com cinetina para a matéria seca da parte aérea de *V. sincorana*, com maior média (1,94) observada ao utilizar o CIN no meio de cultura (Figura 3E). Dados que discordam de Silva (2010) que em estudo desenvolvido com *Aechmea blanchetiana*, não obteve diferença entre as concentrações de citocininas e o tratamento controle para essa variável.

É possível observar médias reduzidas quando considerado a matéria seca das raízes ou da parte aérea, sendo esses os valores reais de constituição do esqueleto de carbono da planta, pois não apresentam a influência da água. A média diminuta obtida para as raízes nessa variável condiz com a ação geralmente observada das citocininas que não estimulam o processo de formação das mesmas, sendo segundo Grattapaglia e Machado (1998), na maioria das culturas, necessária a introdução das auxinas no meio de cultura na etapa de enraizamento.

Para a porcentagem de explante responsivo em relação a concentração de citocininas obteve-se médias superiores em todos os tratamentos com adição de reguladores, diferindo significativamente do controle (Tabela 5). Os dados do presente estudo concordam com Abdi et al. (2013) que trabalhando com *Aloe vera* observaram ausência de brotos no tratamento controle e maiores médias na presença das citocininas BAP e CIN.

Tabela 5 - Porcentagem de explante responsivo de *V. sincorana* submetida a diferentes concentrações das citocininas BAP e CIN.

Concentração (μM)	% de explante responsivo
0,0	1,00b
5,0	20,00a
10,0	12,50a
15,0	20,00a
20,0	17,50a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Em relação ao comprimento da parte aérea, obteve-se influência do tipo e concentração de citocinina com as maiores médias sendo observadas em altas concentrações de BAP 15,0 e 20,0 μM (Tabela 6). Embora, segundo Flores et al. (2009) elevadas concentrações de BAP possam causar toxidez no cultivo *in vitro*, o que resulta em inibição no crescimento, a espécie em estudo apresentou comportamento oposto. Os resultados obtidos discordam de Lima-Brito et al. (2011), em trabalhos com *Comanthera mucugensis*, no qual observaram decréscimo do comprimento da parte aérea na presença do BAP, sendo obtida média superior na ausência do mesmo.

Em relação a mesma variável, obteve-se na presença da cinetina comportamento contrário ao do BAP, obtendo-se médias superiores nas concentrações 5,0 e 10,0 μM e decréscimo do comprimento a medida que aumentou-se a adição da mesma (Tabela 6). Os dados observados destacam a influência da concentração e composição do regulador de crescimento nas culturas, fatores que influenciam o crescimento e desenvolvimento das mesmas (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998). Resultado oposto ao do Candombá foi obtido por Silveira (2009) em trabalhos com *Neoglaziovia variegata*, observando comprimento superior dos brotos na ausência de CIN.

Para matéria fresca da parte aérea, observou-se interação entre o tipo e a concentração de citocininas não havendo diferença entre as concentrações de BAP e sua ausência. Para a cinetina, obteve-se médias superiores nas menores concentrações 5,0 e 10,0 μM e declínio da matéria fresca nas maiores concentrações testadas (Tabela 6). Esse comportamento é similar ao citado para comprimento da parte aérea destacando-se a influência do regulador de crescimento na capacidade de promover ou inibir o ganho de matéria fresca dependendo da concentração

utilizada. Esses dados contrapõe Santos et al. (2008) cultivando *in vitro* *Ananas comosus*, que obtiveram declínio dessa variável ao longo do aumento das concentrações de BAP.

Tabela 6 - Comprimento da parte aérea, matéria fresca da parte aérea e comprimento da maior raiz de *V. sincorana* submetida a diferentes concentrações das citocininas BAP e CIN.

Concentração (μM)	Comprimento da parte aérea (mm)	
	BAP	CIN
0,0	31,23aB	31,23aC
5,0	30,19bB	46,33aA
10,0	32,27bB	45,02aA
15,0	37,80 aA	38,62aB
20,0	39,25aA	36,05aB

Concentração(μM)	Matéria fresca da parte aérea (mg)	
	BAP	CIN
0,0	6,39 aA	6,39 aB
5,0	6,64 bA	12,29 aA
10,0	5,52 bA	10,16 aA
15,0	7,39 aA	8,52 aB
20,0	7,26 aA	8,94 aB

Concentração(μM)	Comprimento da maior raiz (mm)	
	BAP	CIN
0,0	42,50 aA	42,50aA
5,0	30,61bB	52,94aA
10,0	37,97bB	52,18aA
15,0	49,46aA	48,70aA
20,0	53,36aA	47,07aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Considerando o comprimento da maior raiz, observou-se resultado similar a matéria fresca e comprimento da parte aérea com influência do tipo e da concentração de citocinina. Para as concentrações de cinetina utilizadas não houve diferença estatística entre o controle e os demais tratamentos, no entanto, obteve-se comportamento oposto com a citocinina BAP apresentando maiores médias no controle e nas elevadas concentrações utilizadas (15,0 e 20,0 μM) (Tabela 6). Os dados obtidos corroboram Silva (2010) que trabalhando com *Aechmea blanchetiana*,

observou maior influência do BAP no comprimento das raízes.

A adição do BAP no meio de cultivo, geralmente provoca inibição do sistema radicular nos vegetais, no entanto comportamento contrário foi observado nos resultados obtidos para a espécie, evidenciando a inter-relação entre o balanço das substâncias de crescimento endógenas e exógenas para indução ou inibição das raízes (MONFORT et al., 2012)

Embora no presente estudo os resultados obtidos não apresentem alta taxa de multiplicação, a cultura de tecidos deve ser considerada como possível alternativa sustentável para a espécie esingular caminho para o desenvolvimento de estudos fisiológicos relacionados a resposta vegetal ao estresse. Essa potencialidade tornou-se evidente diante do sucesso no estabelecimento *in vitro* do Candombá e da acentuada emissão de brotos observada em plantas estabelecidas *in vitro* durante o período de cultivo, quando houve uma significativa redução da quantidade de meio de cultura. É provável que a emissão de brotos devido ao estresse hídrico esteja relacionada ao comportamento da espécie em seu ambiente natural, no qual sua reprodução está diretamente relacionada a períodos de queimadas, sendo a exploração dessa capacidade um caminho oportuno para alcançar elevada produtividade de mudas do Candombá.

4CONCLUSÕES

A cinetina apresentou melhor resposta para a indução de brotos, quando comparado ao BAP.

Os reguladores nas concentrações testadas não foram eficientes para a obtenção de uma taxa satisfatória de formação de broto.

Sugere-se o desenvolvimento de novos experimentos com outras citocininas isoladas ou combinadas com auxinas.

A cultura de tecidos deve ser considerada como possível alternativa sustentável para a espécie e no desenvolvimento de futuros estudos fisiológicos relacionados à resposta vegetal ao estresse.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, G.; HEDAYAT, M.; MODARRESI, M. *In vitro* micropropagation of *Aloe vera* – impactos of plant growth regulators, media and type of explants. **Journal Biololy Environmental Science**. v.7 n. 19 p. 19-24, 2013.
- ALMEIDA, R.O.; Aprendizagem sobre o candombá... e sobre as relações entre sujeitos...e entre sujeitos e candombás. **Candombá**, v.2, n.1, p 37-49, 2006.
- AYENSU, E.S.; SMITH, L.B. A Revision of American Velloziaceae. **Smithsonian Instituion Press**. Washington, 1976.
- BANDINELLI, M.G.; BISOGNIN, D.A.; GNOCATO, F.S.; MAMBRIN, R.B.; SAUSEN, D.; NICOLOSO, F.T. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, v.31, n.2, p. 242-247, 2013.
- BORGES, B.P.S. **Estabelecimento e regeneração *in vitro* de *Vellozia sincorana* AYENSU & SMITH**. 2013. 37p. Trabalho de conclusão de Curso (Monografia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- CARVALHO, A.C.P.P.; PINHEIRO, M.V.M.; DIAS, G.M.G.; MORAIS, J.P.S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.1, p.103-108, 2009.
- CARVALHO, F.M.J.; VIDAL, S.M. **Noções básicas de cultura de tecidos**. Documentos 116. Embrapa, Outubro, 2003.
- CONCEIÇÃO, A. Entrevista com Abel Conceição sobre fogo. **Grupo Contrafilé** Janeiro, 2010.
- CONCEIÇÃO, A.; ORR, B.J. Post-fire flowering and fruiting in the endemic caulescent rosette *Velloziasincorana* (monocotyledonous) inflammable plant. **Acta Botânica Brasilica**. v.26, n.1, p. 94-100, 2012.
- COSTA, G.M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p. 1090-1096, 2010.
- DWIVEDI, N.K.; INDIRADEVI, A.; ASHA, K.I.; NAIR, R. A.; SUMA, A. A protocol for micropropagation of *Aloe vera* L. (Indian Aloe) – a miracle plant. **Research in Biotechnology**, v.5, n.1, p.01-05, 2014.
- FERREIRA, F.D. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B. Benzilaminopurina (BAP) thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.11, n.3, p. 292-299, 2009.

FREITAS NETO, G.O. **Micropropagação e anatomia foliar de Canela-de-Ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex schult f.- Velloziaceae) em diferentes condições ambientais**. 2009, 82p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

FUNCH, L.S.; HARLEY, R.; FUNCH, R.; GIULIETTI, A.M.; MELO, E. **Plantas úteis da Chapada Diamantina**. São Carlos: RIMA, 2004, 206p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA v.1 p.183 - 260, 1998.

JAYAKRISHNA, C.; KARTHIK, C.; BARATHI, S.; KAMALANATHAN, D.; INDRA, A.P. *In vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Miller, a miracle herb. **Research in Plant Biology**, v.1, n.5 p. 22-26, 2011.

LIMA-BRITO, A.; RESENDE, S.V.; LIMA, C.O.C.; ALVIM, B.M.; CARNEIRO, C.E.; SANTANA, J.R.F. Morfogênese *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. Subsp. *mucugensis*. **Ciência Agrotecnologia**, v.35, n.3, p.502-510, 2011.

MONFORT, L.E.F.; PINTO, J.E.B.D.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ROSSI, Z.T.T.; SANTOS, F.M. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**,v.14, n.3, p.458-463, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **PhysiologiaPlantarum**, v.15, n.6 p. 473-479. 1962.

OLIVEIRA, E.S. **Gaseificação da macaúba**. 2008, 83p. Dissertação (Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, BA.

OLIVEIRA, R.C.S. **Uso e conservação do candombá (*Vellozia sincorana*), planta endêmica da Chapada Diamantina**. 2013, 86p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.

SANTOS, M.D.M.; RIBEIRO, D.G.; TORRES, A.C. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, n.9, p.1115-1120, 2008.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; MACIEL, R.L.A.; DUTRA, F.L. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de *Gloxínia (*sinningia speciosa* Lood, Hiern.)* provenientes de cultura de tecidos. **Ciência Agrotecnologia**, v.27, n.2, p. 255-260, 2003.

SILVA, S.M.G. **Reguladores vegetais no crescimento *in vitro* de bromélia (*Aechmea blanchetiana*)**. 2010. 58p. Dissertação (Mestrado em Horticultura) Faculdade de Ciência Agrônômicas da UNESP. Botucatu.

SILVEIRA, D.G.; SOUZA, F.V.D.; LEDO, C.A.S.; VIDAL, A.M.; SANTANA, J.F.S. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de Caroá. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v.5, n.2, p. 118-128, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5° Ed. Porto Alegre. 2009, 819p.

CAPITULO II

Multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana* utilizando mecanismos de estresse

RESUMO

Vellozia sincorana AYENSU & SMITH é endêmica do Campo Rupestre da Chapada Diamantina, sendo conhecida popularmente como Candombá. Os caules e raízes são utilizados pela população local para acender fogões a lenha e na produção de incenso respectivamente, devido a sua resina altamente inflamável. Diante do estímulo do fogo para a reprodução do Candombá em ambiente natural, este trabalho teve como objetivo analisar o comportamento dos brotos *in vitro* quando em contato com o estresse, averiguando a capacidade de multiplicação da espécie. Nesse sentido, os brotos foram expostos ao estresse térmico com a flambagem da região basal por diferentes períodos (0; 2; 4; 6; 8 e 10 segundos) e no segundo experimento testou-se diferentes períodos (0,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 9,0 min.) de exposição de brotos a $105\pm 1^{\circ}\text{C}$, em estufa. O meio de cultura utilizado foi o MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 87,64mM de sacarose, 0,7% de ágar e 1 g.L^{-1} de carvão ativado (meio básico). No experimento de estresse hídrico o meio básico foi suplementado com diferentes concentrações de ágar (7,0; 14,0; 21,0; 28,0g) e no experimento seguinte o meio básico foi acrescido de diversas concentrações de sacarose (87,64; 175,28; 262,92 e 350,56 mM). As maiores médias para número de brotos e porcentagem de explantes responsivos foram obtidos nos períodos de 6, 8 e 10 segundos de flambagem. As diferentes concentrações de ágar e sacarose, não foram significativas para nenhuma das variáveis analisadas. No entanto, os dados obtidos indicam elevada tolerância da espécie ao estresse hídrico e térmico.

Palavras-chaves: Estresse hídrico. Estresse térmico. Tolerância.

ABSTRACT

Vellozia sincorana Ayensu & SMITH is endemic to Rupestres Fields of the Chapada Diamantina, being popularly known as Candombá. The stems and roots are used by local people to light wood stoves and production of incense respectively, due to its highly flammable resin. Before the fire stimulus for playback Candombá natural environment, this study aimed to analyze the behavior of *in vitro* shoots when exposed to stress, checking the reproductive capability of the species. In this sense, the potential was tested the capability for induction of shoots under thermal stress at the basal region of the species for different periods (0.0; 2.0; 4.0; 6.0; 8.0 or 10.0 seconds) and sequite experiment was tested different periods in the sterilizer (0.0; 4.5; 6.0; 7.5 or 9.0 min.) and $105\pm 1^{\circ}\text{C}$, in sterilize. The culture medium used was MS/2 medium supplemented with 87.64mM sucrose, 0.7% agar and $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of activated charcoal (basic medium). For drought stress basic medium was agar supplemented with different concentrations (7.0; 14.0; 21.0; 28.0 g) and the following experiment different sucrose concentrations (87.64; 175.28; 262.92; 350.56 mM). The highest average for number of shoots and percentage of responsive explants were obtained in periods of 6, 8 and 10 seconds flame. The different concentrations of sucrose and agar, were not significant for any of the variables. However, the data indicate high tolerance of the species to water and heat stress.

Key Words: Water stress. Heat stress. Tolerance.

1 INTRODUÇÃO

A *Vellozia sincorana* AYENSU & SMITH, Velloziaceae, conhecida popularmente como Candombá é uma espécie endêmica da Chapada Diamantina, característica dos Campos Rupestres. Seu caule grosso e fibroso possui grande resistência às queimadas, além de produzir uma resina que queima muito facilmente, mesmo quando úmida, favorecendo a propagação de incêndios, característica peculiar que induz a retirada da espécie pela população local para acender fogões a lenha e para a produção de incenso, com a resina retirada das suas raízes (ALMEIDA, 2006).

Embora a densidade populacional do Candombá seja elevada, sua pequena distribuição e a relação diferenciada com o fogo para a floração, combinadas com uma exploração puramente extrativista, de suas raízes e troncos para o uso da resina, tornam urgentes medidas para ampliar o conhecimento sobre a mesma que ainda apresenta estudos restritos a trabalhos de taxonomia, ecologia e etnobotânica, Ayensu e Smith (1976), Funch et al. (2004), Almeida (2006), Oliveira (2008), Conceição e Orr (2012) e Oliveira (2013) não havendo relatos na literatura sobre sua propagação.

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado para entender fisiológica e bioquimicamente o metabolismo dos vegetais, suas respostas e capacidade de tolerância em diversos trabalhos como os de Sá et al. (2014), Carvalho (2007) e Viana (2005) em estudos com estresse salino, térmico e hídrico, respectivamente. Essa técnica apresenta vantagens na seleção de genótipos resistentes a determinado estresse, devido a possibilidade de manutenção em ambiente controlado com meio de cultura contendo substâncias e concentrações definidas (CANÇADO et al., 2009).

A sacarose geralmente é uma dessas substâncias, sendo adicionada ao meio de cultivo como fonte de carboidratos, o que proporciona energia metabólica e esqueleto de carbono para a biossíntese de todos os compostos orgânicos essenciais para o crescimento das células (CALDAS et al., 1988). Além disso, tem influência ainda no potencial osmótico do meio de cultivo, podendo provocar excessivo aumento desse potencial, quando adicionado em concentrações acima de 4% (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Segundo Flores et al. (2013) esse osmorregulador, quando adicionado em alta concentração ao meio de cultivo,

poderia provocar a remoção da água intracelular, através do gradiente osmótico, levando a alterações no crescimento e nas respostas fisiológicas dos vegetais.

Outro componente adicionado ao meio de cultivo, o ágar, comumente utilizado para solidificar o meio, possui a característica de ser dissolúvel em água fervente e gelificado quando em temperatura ambiente, sendo geralmente adicionado em concentrações que variam de 0,4% a 1% no meio de cultivo (CALDAS et al., 1998). A alta concentração de ágar pode provocar aumento do potencial osmótico, o que resulta em maior resistência a difusão de nutrientes para o explante (Leite, 1993; Rezende et al., 2005), dificultando ainda, segundo Paiva et al. (1999), a introdução do explante no meio de cultura. O aumento do potencial osmótico do meio pode induzir o estresse hídrico nos vegetais, possibilitando o estudo da potenciabilidade da espécie na resposta ao déficit hídrico.

Em seu ambiente natural, os vegetais estão expostos tanto a estresses bióticos, quanto abióticos, os quais induzem uma modulação de respostas de defesa, possibilitando a recuperação do metabolismo normal (SOARES; MACHADO, 2007; CLEMENTE-PÉREZ; CADENAS-GOMÉZ, 2012). Segundo Lacher (2003) o estresse pode ser considerado, como um desvio das condições ótimas de sobrevivência, provocando mudanças de todas as respostas do organismo, podendo ser reversível ou irreversível, dependendo da duração e do limite de resistência da planta.

A capacidade de tolerância ao estresse dos vegetais vem atraindo pesquisadores, com o intuito de selecionar plantas resistentes em programas de melhoramento genético na busca por espécies cada vez mais tolerantes (WARG et al., 2003) a estresse hídrico, alta temperatura, dentre outros, visando avanços na agricultura.

As respostas da planta ao déficit hídrico são complexas envolvendo tolerância, adaptações e/ou efeitos danosos, respostas que diferem de acordo com o genótipo. Em geral ele está inter-relacionado a tolerância e sensibilidade a outros estresses, como a alta temperatura, um dos mais críticos fatores que influenciam a distribuição do ambiente físico do vegetal, podendo afetar a fotossíntese, a estabilidade da membrana e sua estrutura celular (CHAVES et al., 2002; HOPKINS, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A exposição do vegetal ao estresse pode provocar antecipação da reprodução, com a produção de flores e sementes antes que a água seja totalmente

exaurida, no caso de estresse hídrico ou acúmulo de reservas direcionados para a reprodução (CHAVES et al., 2002).

Nos casos relacionados a estresse térmico, plantas denominadas pirofíticas, que são espécies com adaptações singulares aos ambientes de queimadas, apresentam, após alguns dias ou semanas da passagem do fogo intensa rebrota, característica provavelmente relacionada a ação do fogo na quebra de dormência das gemas (COUTINHO, 1994).

Com base nos conhecimentos sobre o estímulo do fogo para a reprodução de *Candombá* em condições naturais, este trabalho se propôs a investigar o comportamento dos brotos *in vitro* quando expostos a estresse, tendo em vista avaliar a capacidade de multiplicação da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

2.2 Material Vegetal

As sementes foram coletadas na Serra do Candombá, na Chapada Diamantina (BA) e armazenadas em sacos de papel sob a temperatura de 5 ± 1 °C em geladeira no LCTV.

2.3 Condições de Cultivo

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Os experimentos foram realizados utilizando tubos de ensaio (25x150mm), contendo 10 ml de meio de cultura com os mesmos sendo vedados com Policloreto de Vinila (PVC).

2.4 Estabelecimento *in vitro* de *Vellozia sincorana*

As sementes permaneceram em água corrente por 30 minutos, foram desinfestadas em álcool 70% (1min) seguido de hipoclorito de sódio a 2,5% mais uma gota de detergente (10min), sendo posteriormente lavadas em água destilada estéril por três vezes. A semeadura foi feita em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas ($\text{MS } \frac{1}{2}$) suplementado com 87,64mM de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e acrescido de $1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de carvão ativado (meio básico). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 1$ e o meio foi autoclavado à temperatura de 121°C por 15 minutos (BORGES, 2013).

Plantas estabelecidas foram cultivadas *in vitro* por 2 anos, sendo transferidas para meio da mesma composição, a cada 6 meses. Os brotos emitidos das plantas foram transferidos e cultivados em meio básico para a execução dos experimentos de multiplicação.

2.5 Estresse Térmico

2.5.1 Efeito de diferentes períodos de flambagem na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

Microplantas com 60 dias foram submetidas a diferentes períodos de flambagem, a qual consistiu na exposição da região basal da microplanta ao fogo de uma lamparina utilizando movimentos verticais. Os tratamentos consistiram de cinco períodos de exposição (0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 segundos) controlados por um temporizador. Em cada período as microplantas entraram em contato com o fogo por 0, 4, 8, 12, 16 e 20 vezes respectivamente. Em seguida foram inoculadas em meio de cultura básico.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por 10 repetições, cada uma com dois tubos. Após 35 dias avaliou-se o número de brotos por explante, a porcentagem de explantes responsivos, o comprimento do maior broto e a porcentagem de sobrevivência do explante.

2.5.2 Efeito de diferentes períodos de exposição a alta temperatura na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

Microplantas com 20 dias foram inoculadas em meio básico e mantidas em estufa de secagem e esterilização com temperatura de $105 \pm 1^\circ\text{C}$, regulada por um termômetro. Os tratamentos consistiram de cinco períodos de exposição (0,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0 minutos).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por dez repetições, cada uma com dois tubos. Após 30 dias foram avaliados o número de brotos por explante, porcentagem de explantes responsivos e porcentagem de sobrevivência.

2.6 Estresse Hídrico

2.6.1 Efeito de elevadas concentrações de ágar na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

Microplantas com 80 dias foram inoculadas em meio básico contendo diferentes concentrações de ágar (7; 14; 21 e 28g). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por nove repetições, cada uma com dois tubos.

Após 85 dias avaliou-se o número de brotos e porcentagem de explantes responsivos.

2.6.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

Microplantas com 25 dias foram inoculadas em meio básico composto por diferentes concentrações de sacarose (87,64; 175,28; 262,92 e 350,56 mM). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por sete repetições, cada uma com dois tubos.

Após 30 dias avaliou-se o número de brotos, porcentagem de explantes responsivos e porcentagem de sobrevivência.

2.7 Análise Estatística

Os dados foram avaliados, mediante a análise de variância, sendo transformados pela função $(x+1)^{1/2}$. As médias foram analisadas pelo teste Scott-Knott e o programa utilizado foi o SISVAR, v 5.3, desenvolvido pela UFLA (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estresse Térmico

3.1.1 Efeito de diferentes períodos de flambagem na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

De acordo com a análise de variância, a fonte de variação período de flambagem foi significativa ($p < 0,05$) para as variáveis número de brotos (NB) e porcentagem de explantes responsivos (%ER), sendo altamente significativo ($p < 0,01$) para comprimento do maior broto (CMB) e porcentagem de sobrevivência (%SOB) (Tabela 7). Esses dados tornam evidentes a sensibilidade diferenciada do *Candombá* a ação do fogo.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), % explantes responsivos (%ER), comprimento do maior broto (CMB) e % sobrevivência (%SOB) de *V. sincorana* submetidas a diferentes períodos de flambagem.

FV	GL	Quadrados Médios			
		NB	%ER	CMB	%SOB
Período/Flambagem	5	0,4626*	27,0069*	0,0917**	41,1005**
Resíduo	54	0,1524	11,0908	0,0250	10,3527
CV%		31,89	103,10	56,84	45,54

*.Significativo ao nível de 5% pelo teste F; **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Dados transformados $(x+1)^{1/2}$

A variável número de brotos apresentou médias superiores (0,85, 1,75, 1,10) nos períodos de 6, 8 e 10 segundos de flambagem da região basal diferindo significativamente dos demais tratamentos testados (Tabela 8). A emissão de brotos após a flambagem da parte basal da espécie em estudo, provavelmente está relacionada ao seu ambiente de origem, no qual há ocorrência de queimadas. A denominação de fênix do reino vegetal dada a espécie em estudo por Oliveira (2008), provavelmente está relacionada à capacidade de regeneração da mesma, após a passagem do fogo. Além disso, a floração em abundância posterior aos incêndios e sua resina altamente inflamável sugerem uma integração entre a *V. sincorana* e as queimadas no processo evolutivo tornando-a um indivíduo diferenciado, sendo altamente adaptado a temperaturas extremas.

Sugere-se que esses brotos são oriundos de gemas protegidas por uma densa quantidade de folhas que se dispõe em formato de roseta na base do rizoma.

Mecanismo similar foi observado por Neves e Conceição (2010) em trabalho desenvolvido com a espécie *Cottendorfia florida* em ambiente natural, que rebrotou de gemas protegidas pelas suas folhas rosuladas após a queimada.

Outra região da planta protegida em ambiente natural da ação do fogo é o meristema radicular, que é o principal local de síntese de citocininas livres (TAIZ; ZEIGER, 2009). As raízes ficam resguardadas no interior do solo, no qual a temperatura é amena marcando 40°C a 1cm, 33°C a 2cm chegando a 25°C em 5cm de profundidade, conforme experimento realizado no Cerrado (COUTINHO, 2002). Considerando a emissão de brotos observada, após a flambagem da região basal do Candombá e a influência direta da citocinina na produção de brotos, pode-se sugerir uma maior produção desse regulador de crescimento pela espécie, após o contato com o fogo. De acordo com Kerbauy (2008) e Taiz e Zeiger (2009), a elevação desse hormônio induziria uma relação fonte-dreno na planta com os novos brotos agindo como drenos, tendo em vista que os nutrientes são preferencialmente transportados e acumulados em tecidos com presença de citocininas. Por conseguinte, os recursos da planta seriam direcionados para a reprodução, perpetuando a espécie.

Tabela 8 – Número de brotos (NB) e (%) explantes responsivos (%ER) de *V. sincorana* submetida a diferentes períodos (0, 2, 4, 6, 8 e 10 segundos) de flambagem da região basal.

Períodos (s)	Número de brotos	Explantes responsivos (%)	Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si
0,0	0,10 b	10,0 b	
2,0	0,25 b	10,0 b	
4,0	_____*	_____*	
6,0	0,85 a	40,0 a	
8,0	1,75 a	40,0 a	
10,0	1,10 a	30,0 a	

nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. * Dado Perdido.

Em relação a porcentagem de explantes responsivos, observou-se comportamento similar sendo obtidos os maiores valores (40%, 40% e 30%) nos períodos de 6, 8 e 10 segundos (Tabela 8)(Figura 5).

A população de *V. sincorana* utilizada apresentou diferença de responsividade o que se reflete no alto coeficiente de variação obtido, característica que pode ser associada a variabilidade genética dentro da espécie. Algumas microplantas

apresentaram resistência ao estímulo da temperatura tanto com a ausência de indução de broto e/ou emitindo apenas 1 propágulo, quanto microplantas com elevada produção com 8, 7 e 6 perfilhos. Resposta similar da influência do genótipo foi relatada por Freitas Neto (2009) em trabalho com a *Velloziaflavicans* que observou variabilidade marcante na resposta de plantas de uma mesma população obtendo tanto plantas com grande número de brotos (12), quanto outras que foram denominadas recalcitrantes com a emissão de apenas um, estando as mesmas sobre igual concentração dos reguladores de crescimento BAP, CIN e AIB.

De acordo com Soares et al. (2012) o potencial morfogenético pode ser influenciado pela variação de resposta entre genótipo, de forma marcante quando se utiliza espécies selvagens que apresentam elevada variabilidade genética. Nesses casos, o cultivo *in vitro* pode auxiliar na seleção de clones com características superiores, ou seja, genótipos com alta produtividade servindo de ferramenta para o melhoramento genético (FERREIRA et al., 1998).

O processo de emissão de brotos foi iniciado com 7 dias após o contato com o fogo, sendo observado o acentuado desenvolvimento dos mesmos (Figura 6). Essa característica pode ser observada em espécies de regiões onde ocorrem queimadas (Cstry et al., 2007), as quais possuem alta resiliência, ou seja, conseguem recuperar rapidamente características anteriores ao fogo. Esse comportamento foi reportado ainda por Coutinho (1994) que se refere a fascinante rapidez e vigor das plantas para emitir brotações após a ocorrência de queimadas.

Para a variável comprimento do maior broto, as maiores médias foram obtidas nos períodos 6, 8 e 10 segundos, sendo observado diminuição do comprimento a medida que se aumentou os tempos de flambagem (Tabela 9). Esse resultado pode ser relacionado a superior emissão de brotos nos tratamentos 8 e 10 segundos provocando maior competição por nutrientes. Os resultados obtidos concordam com Freitas Neto (2009) que observou similar resposta antagônica entre comprimento e número de brotos em estudo desenvolvido com a *V. flavicans*.

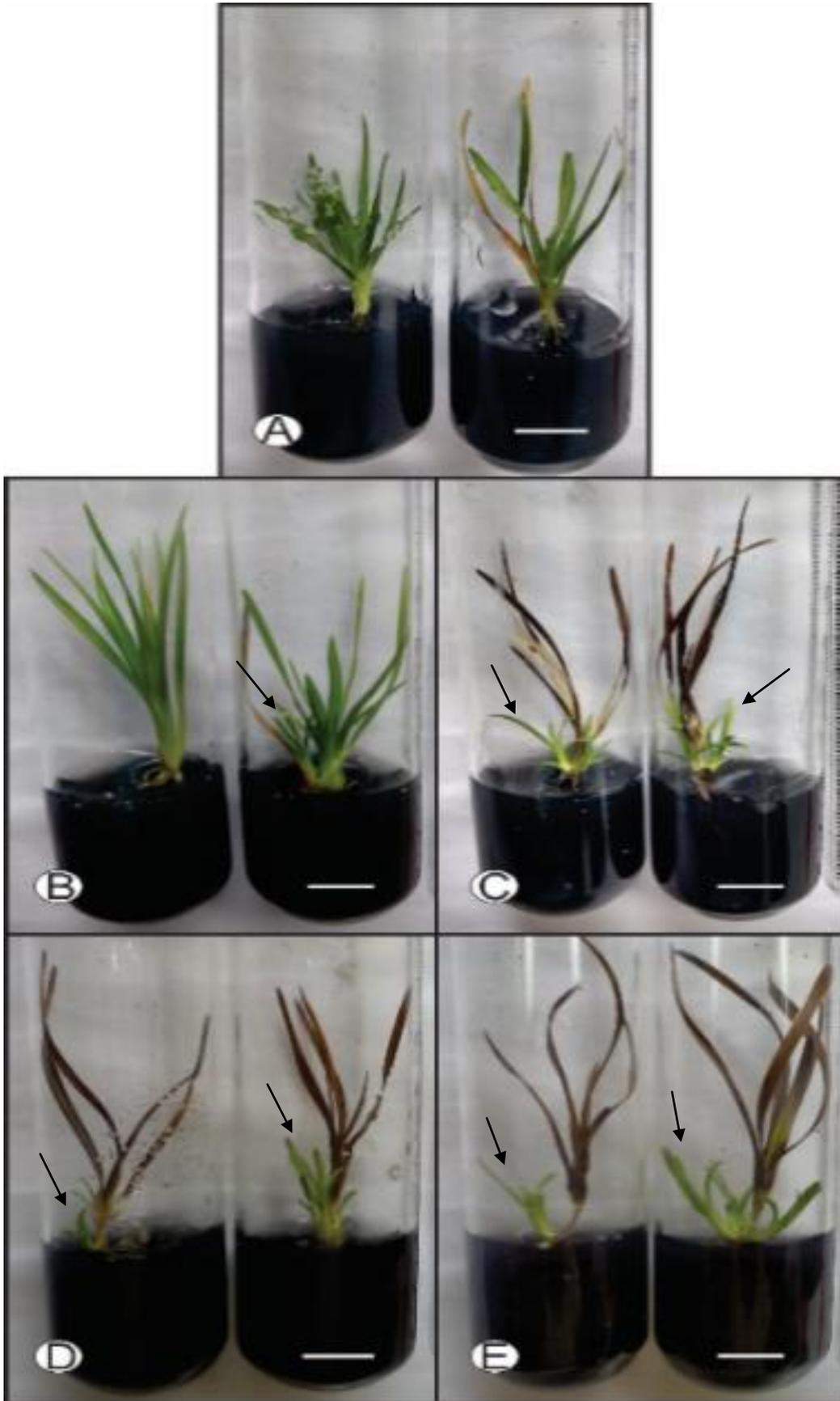


Figura 5- *V. sincoranaos* 35 dias submetida a diferentes períodos de flambagem da região basal (0-A; 2-B; 6-C; 8-D e 10-E segundos). Escala 1cm.

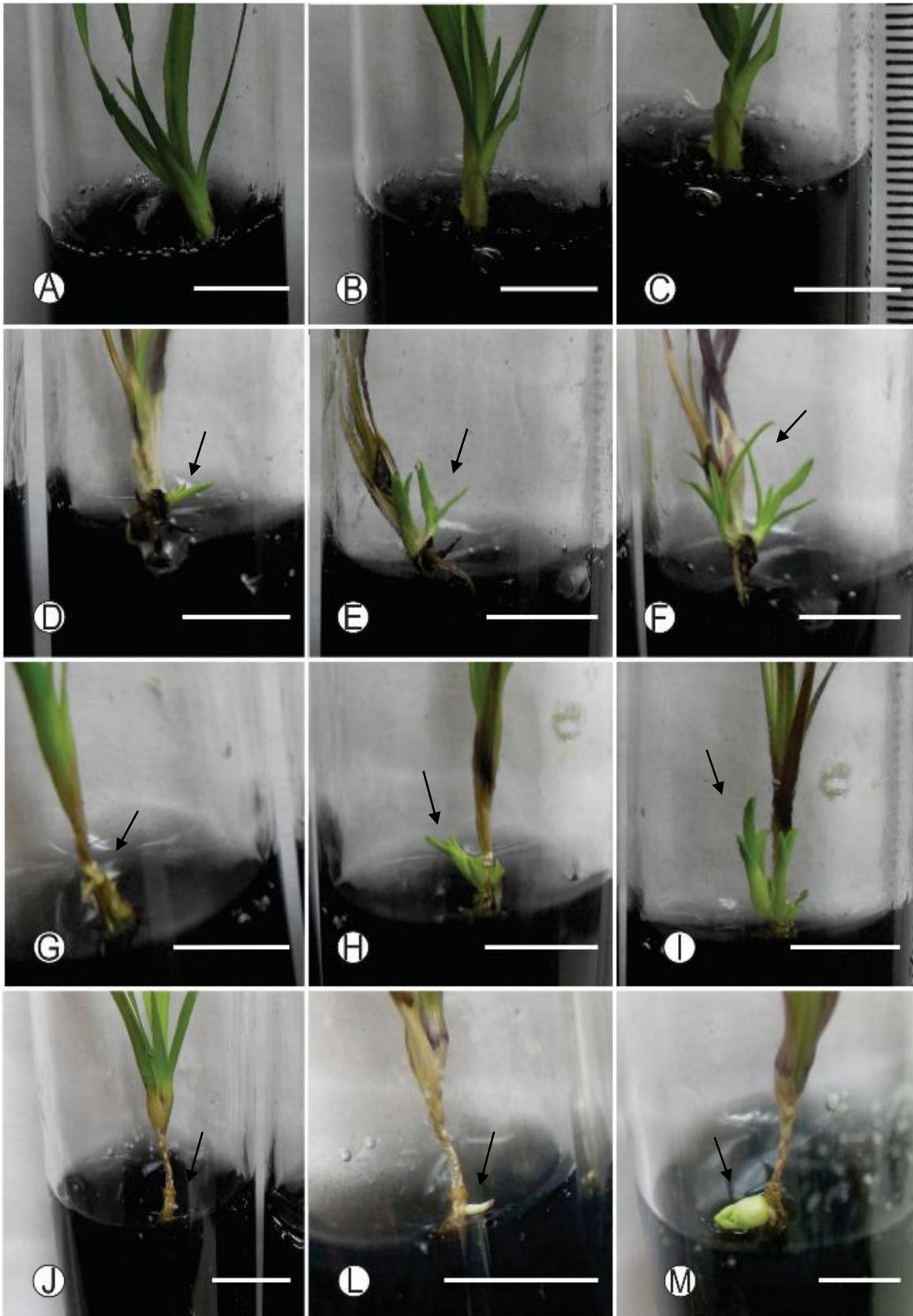


Figura 6-*V. sincorana* aos 7, 14 e 21 dias (1°, 2° e 3° coluna, respectivamente) submetida a diferentes períodos de flambagem da região basal (0, (A,B,C) 6, (D,E,F) 8 (G,H,I) e 10 (J,L,M) segundos). Escala 1cm.

Em relação a variável porcentagem de sobrevivência do explante, observou-se as maiores médias no tratamento controle e no tempo de 2 e 6 segundos com diminuição da sobrevivência nos demais períodos testados (Tabela 9). Esses resultados podem ser relacionados com o ambiente natural da espécie em estudo, pois embora a mesma apresente proteção das suas gemas contra o fogo rápido, Kolberk e Alves (2008) constataram em trabalhos sobre a influência do fogo no Cerrado, que uma queimada com intensidade elevada, devido a presença de maior material combustível, prejudica de modo marcante as espécies adaptadas, podendo provocar graves índices de mortalidade como foi observado por esses autores para espécie *Vellozia kolbekii*.

Tabela 9 - Comprimento do maior broto (CMB) e (%) sobrevivência (%SOB) de *V. sincorana* submetida a diferentes períodos (0, 2, 4, 6, 8 e 10 segundos) de flambagem da sua região basal.

Períodos (s)	Comprimento do maior broto (mm)	Sobrevivência (%)	Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não difere m estatist
0,0	0,25 b	75,0 a	
2,0	0,00 b	95,0 a	
4,0	*	*	
6,0	5,57 a	60,0 a	
8,0	3,93 a	45,0 b	
10,0	2,78 a	35,0 b	

icamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.*Dado Perdido.

3.1.2 Efeito de diferentes períodos de exposição a alta temperatura na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

De acordo com a análise estatística a fonte de variação período não foi significativa para nenhuma das variáveis testadas (Tabela 10). No entanto, pode-se observar um alto grau de tolerância a elevada temperatura da espécie em estudo, pois não se constatou sinal visível de estresse após ser submetida a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ em nenhum dos períodos testados (Figura 7). Essas observações provavelmente estão relacionadas a resistência natural do Candombá a altas temperatura em ambiente natural, pois segundo Coutinho (1994) uma queimada provoca imediata elevação da temperatura no local, tanto do ar, quanto do solo, sendo que a temperatura do ar pode alcançar 800°C ou mais.

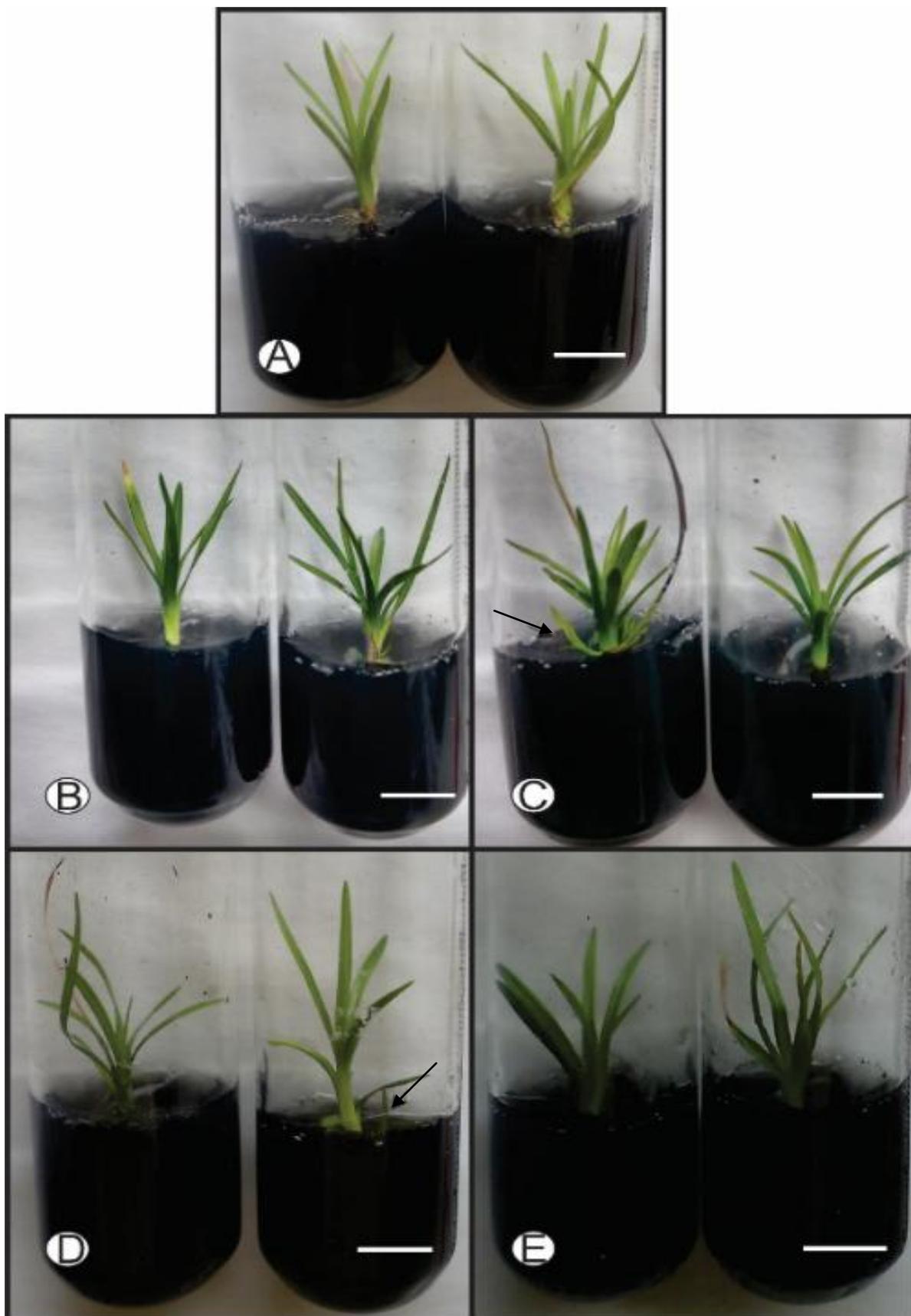


Figura 7 – *V. sincoranaos* 30 dias submetida a diferentes períodos a 105°C na estufa de secagem (A-0; B-4,5; C-6,0; D-7,5; E-9,0 minutos). Escala 1cm

Tabela 10 – Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), (%) explantes responsivos (%ER) e % sobrevivência (%SOB) de *V. sicatorana*, submetidas a diferentes períodos de exposição a alta temperatura.

FV	GL	Quadrados Médios		
		NB	%ER	%SOB
Período	4	0,0081 ^{ns}	0,7449 ^{ns}	0,2537 ^{ns}
Resíduo	45	0,0444	7,9286	0,3383
CV%		19,34	116,87	5,86

^{ns}. Não significativo de probabilidade e pelo teste F. Dos dados transformados $(x+1)^{1/2}$

É importante ressaltar a observação do broto diminuto na região central da folha de *V. sicatorana* no tratamento que foi submetido a 6 minutos na estufa (Figura 8). Essa forma de emissão de brotos diferenciada denominada de epifilia, segundo Kerbauy (2008) ocorre naturalmente nas folhas de plantas do gênero *Bryophilum*. Para a espécie em estudo, porém não há relatos na literatura dessa característica.

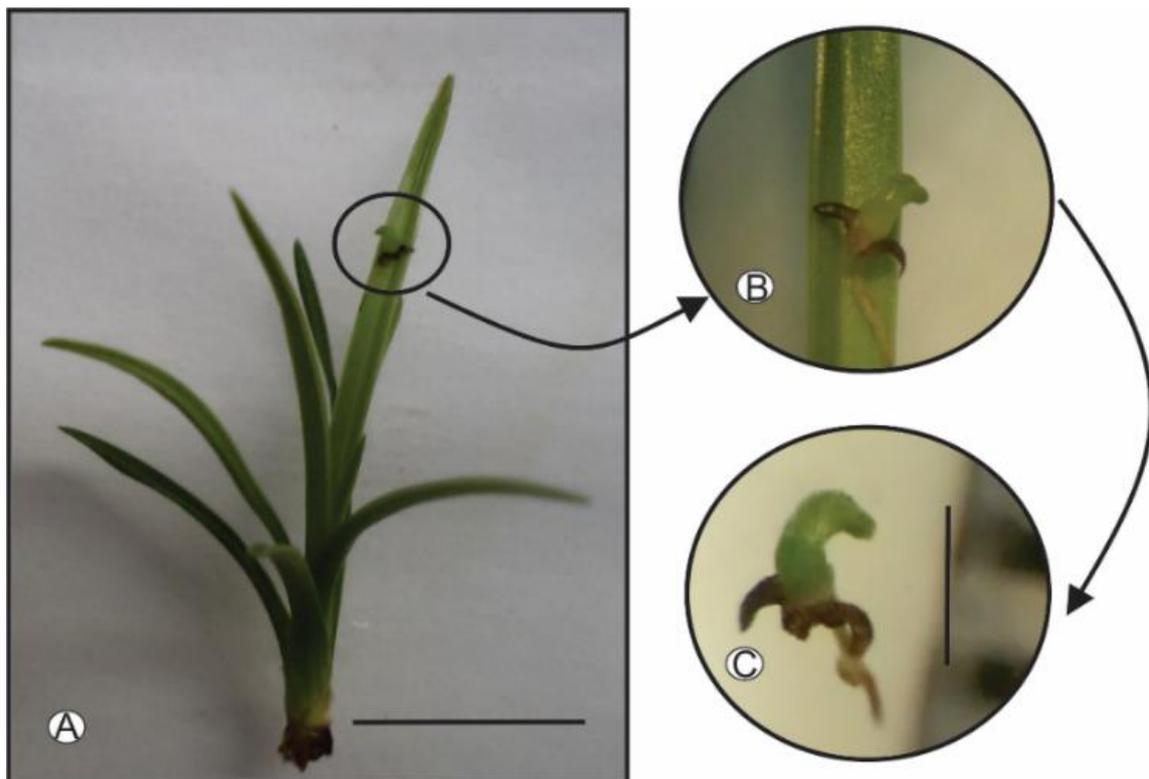


Figura 8 – *V. sicatorana* submetida a 6 minutos na estufa de secagem à temperatura de 105°C. Escala 1 cm.

A indução de brotos no centro de folhas foi documentada em experimento com plantas transgênicas de tabaco, na qual o gene IPT (isopenteniltransferase), um dos genes responsáveis pela síntese da citocinina, foi induzido a se manifestar apenas em partes específicas da planta. Nesses locais com emissão de brotos, como observado na folha constatou-se acumulação de citocinina (Kerbauy, 2008). Esses

dados reforçam a hipótese de que sobre estresse, o Candombá possivelmente apresenta aumento na produção de citocinina, o que estimula a emissão de brotos.

3.2 Estresse Hídrico

3.2.1 Efeito de elevadas concentrações de ágar na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

A fonte variação ágar não foi significativa para número de brotos (NB) e porcentagem de explantes responsivos (%ER) (Tabela 11). Os resultados obtidos sugerem desenvolvimento semelhante tanto utilizando (7,0 g.L⁻¹) de ágar, quanto em sua maior concentração (28,0 g.L¹). Os dados observados para a espécie em estudo contrapõem Peixoto e Pasqual (1995) que constataram, em trabalhos com a videira, redução do acúmulo de água nos tecidos nas maiores concentrações de ágar (10,5 g) adicionadas ao meio de cultura. Segundo esses autores, a concentração elevada de ágar provoca aumento no potencial osmótico do meio, o que consequentemente reduz a absorção de água pelo explante e dificulta a difusão de nutrientes no meio de cultivo.

O comportamento similar do Candombá nas concentrações de ágar utilizadas indica elevada tolerância a um baixo potencial hídrico, considerando ainda a ausência de sinais visíveis de estresse (Figura 9).

Tabela 11 – Resumo da análise de variância para número de brotos (NB) e % explantes responsivos (%ER) de *V. sincorana* submetida a diferentes concentrações de ágar.

FV	GL	Quadrados Médios	
		NB	%ER
Agar	3	0,0326 ^{ns}	6,9846 ^{ns}
Resíduo	32	0,0237	5,2384
CV%		14,50	113,11

^{ns}. Não significativo pelo teste F. Dados transformados (x+1)^{1/2}

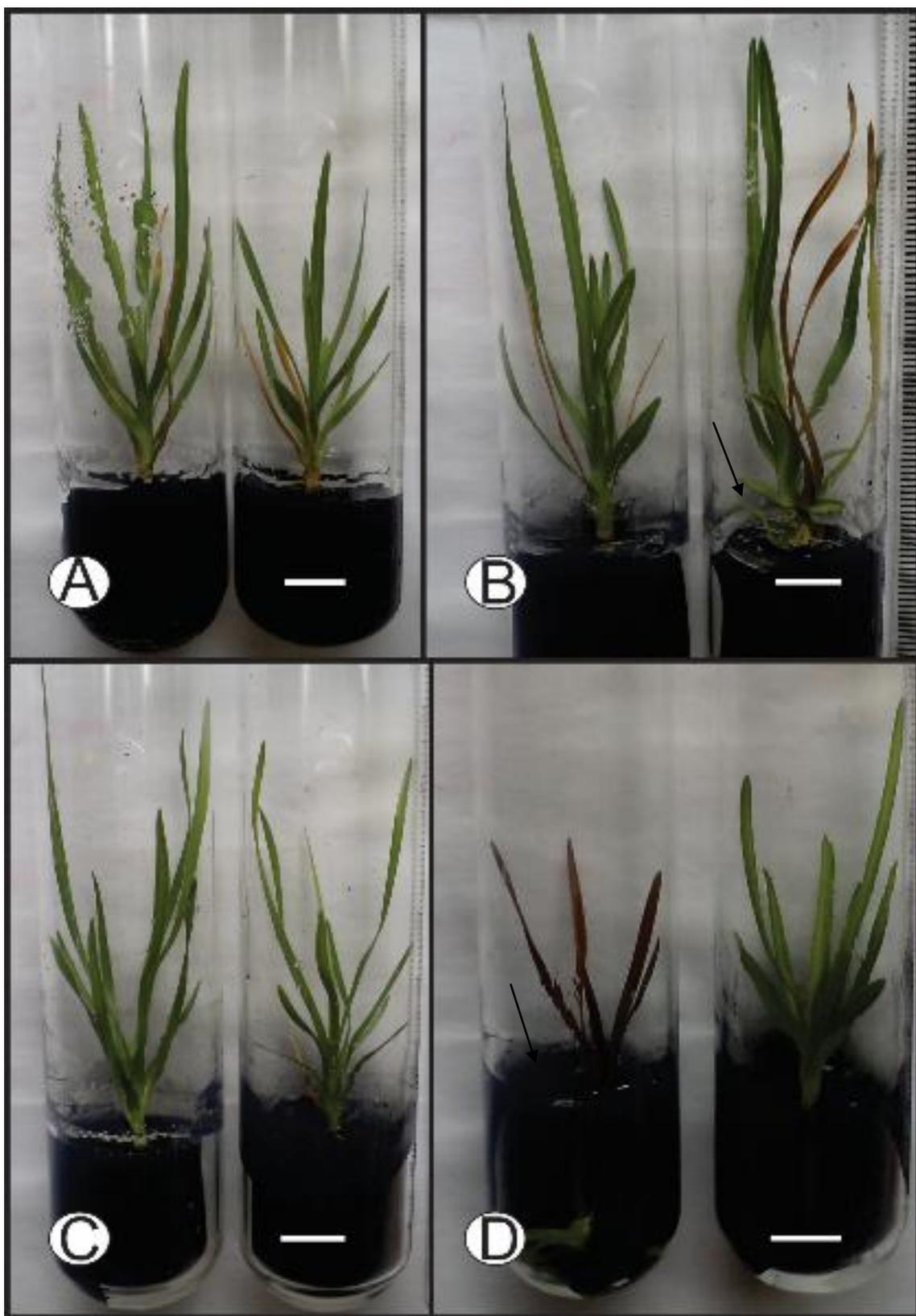


Figura 9 - *V. sincorana* aos 85 dias submetida a diferentes concentrações de ágar (A-7, B-14, C-21 e D-28 g). Escala 1cm.

3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Vellozia sincorana*.

A fonte de variação Sacarose não foi significativa para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 12). No entanto, observou-se alta tolerância ao estresse hídrico da espécie em estudo, o que foi evidenciado pela porcentagem de sobrevivências semelhante, observada no tratamento controle (92%) e na maior concentração de sacarose utilizada (100%) (Figura 10).

Tabela 12–Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), % explantes responsivos (%ER) e % sobrevivência (%SOB) de *V. sincorana* submetida a diferentes concentrações de sacarose.

FV	GL	Quadrados Médios			ns. Não significativo pelo teste F. Dados transformados $(x+1)^{1/2}$
		NB	%ER	%SOB	
Sacarose	3	0,1627 ^{ns}	19,0183 ^{ns}	0,3021 ^{ns}	
Resíduo	24	0,0630	6,5408	0,3021	
CV%		22,30	105,69	5,53	

2

Os dados obtidos para a espécie em estudo, provavelmente estão relacionados ao seu ambiente natural, pois segundo Conceição (2006) geralmente espécies da família Velloziaceae são capazes de sobreviver a situações de restrições hídricas, alta insolação, solos rasos, fortes ventos e oscilações diárias de temperaturas.

A ocorrência de queimadas pode ser considerada como um fator que apresenta influência na resistência ao estresse hídrico, considerando que as altas temperaturas provocam evaporação de água na planta e no solo. Além disso, outro ponto a ser destacado é o efeito indireto posterior a passagem do fogo, que provoca de acordo com Coutinho (1994), a total exposição da superfície do solo a radiação solar diurna e irradiação noturna, elevando a amplitude das variações térmicas diárias.

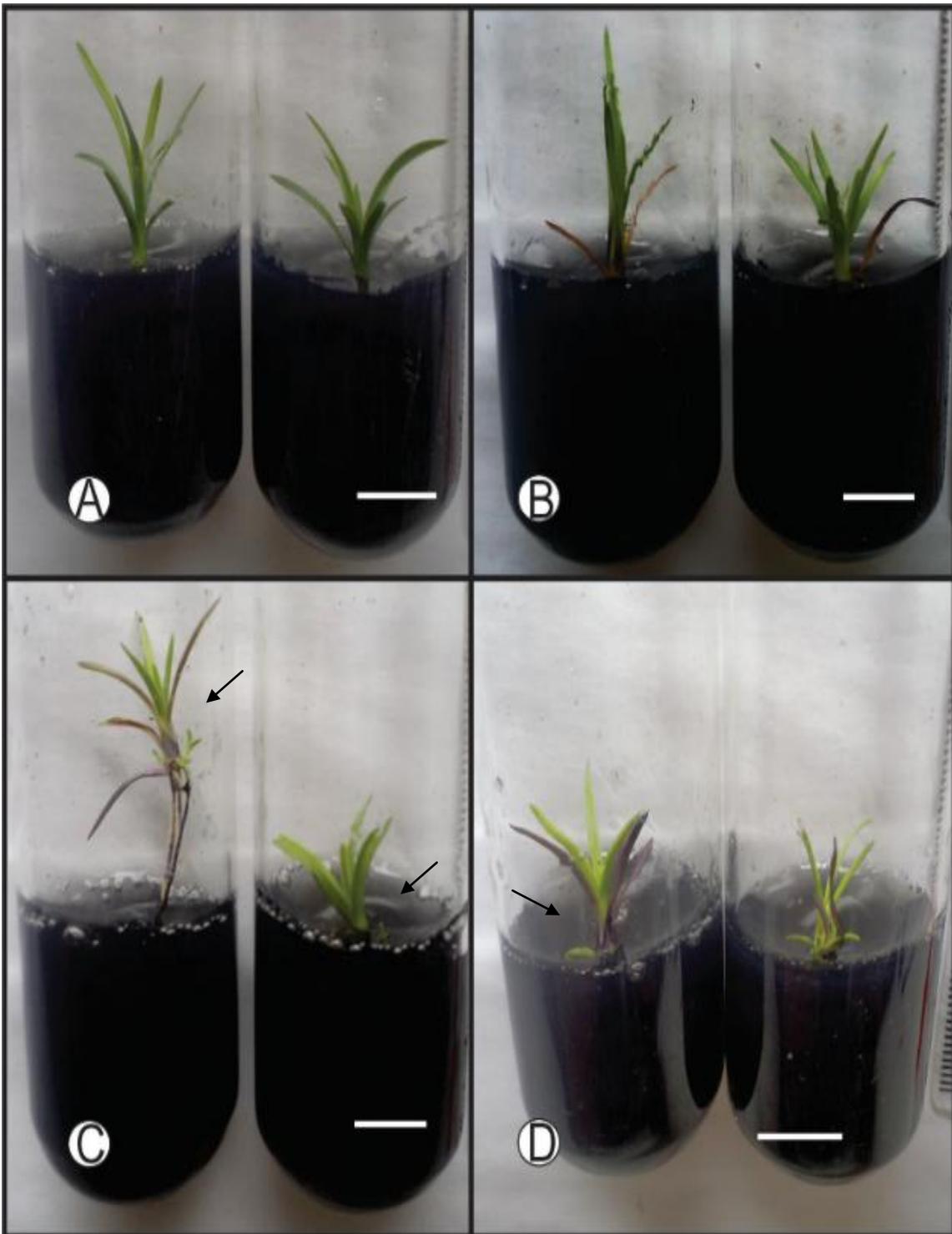


Figura 10- *V. sincoranaos* 30 dias submetida a diferentes concentrações de sacarose (87,64- A; 175,28-B; 262,92-C e 350,56-D mM). Escala 1cm.

De modo similar ao obtido no experimento com estresse térmico a presença de broto na folha foi observada nesse experimento reforçando a influência do

estresse na emissão de brotos e provável aumento na produção de citocinina (Figura 11).

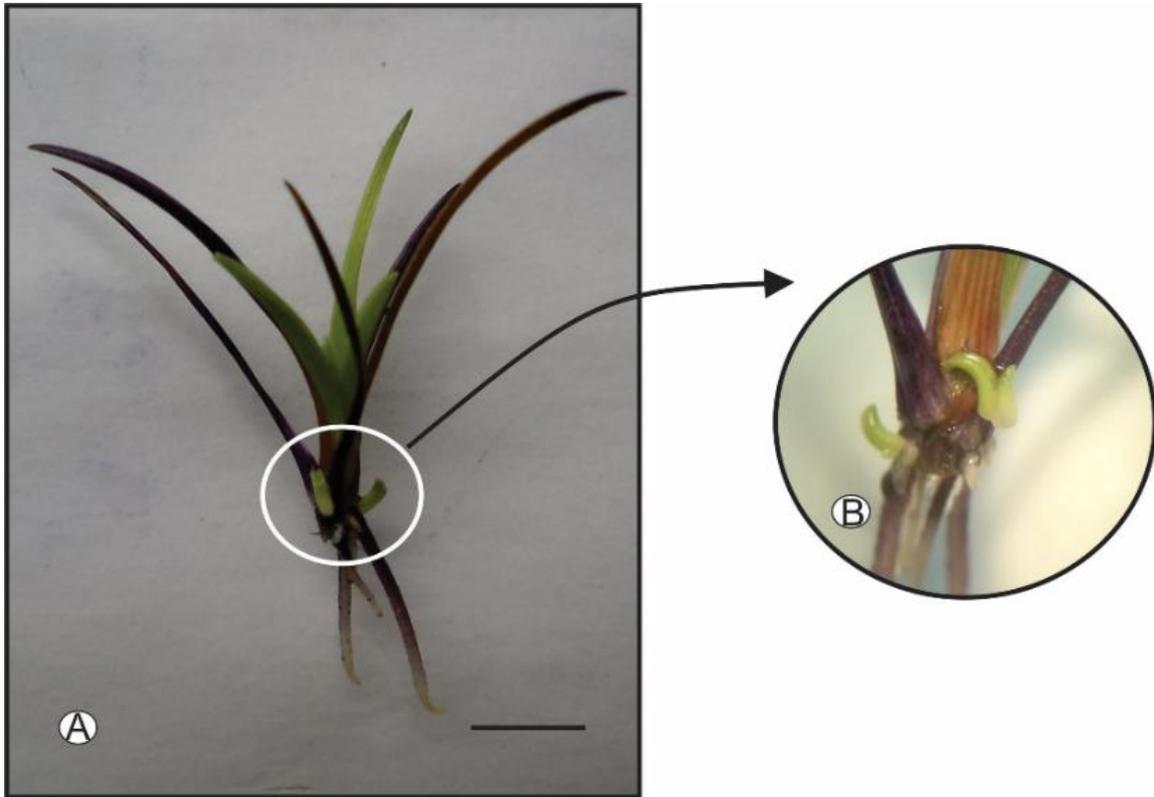


Figura 11 - *V. sincorana* submetida a alta concentração de sacarose 350,56 mM. Escala 1cm.

4 CONCLUSÕES

A flambagem da região basal do Candombá foi mais eficiente na promoção de emissão de brotos, quando comparada com a utilização de reguladores vegetais, sendo as maiores médias para número de brotos obtidos nos períodos 6, 8 e 10 segundos de flambagem. Dentre os reguladores vegetais, a cinetina apresentou melhor resultado para a indução de brotos, porém indica-se a realização de novos experimentos com outras citocininas isoladas ou combinadas com auxinas.

Sugere-se o desenvolvimento de estudos fisiológicos relacionados a capacidade diferenciada da espécie de resposta ao estresse, diante da elevada tolerância a alta temperatura e ao estresse hídrico apresentada pela *V. sincorana*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.O.; Aprendizagem sobre o candombá... e sobre as relações entre sujeitos...e entre sujeitos e candombás. **Candombá**, v.2, n.1, p 37-49, 2006.

AYENSU, E.S.; SMITH, L.B. A Revision of American Velloziaceae. **Smithsonian Institution Press**. Washington, 1976.

BORGES, B.P.S. **Estabelecimento e regeneração *in vitro* de *Vellozia sincorana* AYENSU & SMITH**. 2013. 37p. Trabalho de conclusão de Curso (Monografia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

CANÇADO, A.M.G.; RIBEIRO, P.M.; FREITAS, F.G.; SÁ, L.E.M.; SILVA, E.H.; PASQUAL, M.; VAL, B.D.A.; NUNES, F.C. Cultivo *in vitro* de plantas e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, v.30, n.253, p. 64-74, 2009.

CARVALHO, S.C.E.; **Antioxidante, reguladores de crescimento e estresse térmico na embriogênese somática de *Eucalyptus* spp.** 2007, 114p., Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Universidade federal de Viçosa, Minas Gerais.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. *In*: TORRES. A.C.; CALDAS. L.S.; BUSO. J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA v.1,1998. 864p.

CATRY, F.; BUGALHO, M.; JOAQUIM, S. **Recuperação da floresta após o fogo. O caso da Tapada Nacional de Mafra**. CEABN- Lisboa, 2007.

CONCEIÇÃO, A. Ecologia da vegetação dos Campos Rupestres na Chapada Diamantina. *In*. QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semiárido brasileiro**. Brasília, DF, Brasil, 2006.

CONCEIÇÃO, A.; ORR, B.J. Post-fire flowering and fruiting in the endemic caulescent rosette *Velloziasincorana* (monocotyledonous) inflammable plant. **Acta Botânica Brasilica**. v.26, n.1, p. 94-100, 2012.

COUTINHO, M. L. O bioma Cerrado. *In*: Aldo L. K. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, 2002, 148p.

COUTINHO, M.L. O uso do fogo em pastagens naturais brasileiras. *In*: **Utilización y manejo pastizales**. Montivideu – IICA – PROCISUR, 1994, 266p.

CLEMENTE – PÉREZ, M.R.; CADENAS - GOMÉZ, A.; *In vitro* Tissue Culture, a Tool for the Study and Breeding of Plants Subjected to Abiotic Stress Conditions, **Recent Advances in Plant *in vitro* Culture**. In Tech, p. 92-108, 2012.

CHAVEZ, M.M.; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M.L.; RICARDO, C.P.P.; OSÓRIO, M.L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the Field. Photosynthesis and growth. **Annals of Botany** n.89, p.907-916, 2002.

FERREIRA, F.D. Sisvar: a computer statistical analysis system. **CiênciaAgrotécologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, dez., 2011.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. *In*: TORRES. A.C.; CALDAS. L.S.; BUSO. J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA v.1 p.183 - 260, 1998

FLORES, R.; ULIANA, S.C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T.M.B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v.4, n.3, p.192-1999, 2013.

FREITAS NETO, G.O. **Micropropagação e anatomia foliar de Canela-de-Ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex schult f.- Velloziaceae) em diferentes condições ambientais**. 2009, 82p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

FUNCH, L.S.; HARLEY, R.; FUNCH, R.; GIULIETTI, A.M.; MELO, E. **Plantas úteis da Chapada Diamantina**. São Carlos: RIMA, 2004,206p.

GRATTAPAGLIA. D.; MACHADO. M.A. Micropropagação. *In*: TORRES. A.C.; CALDAS. L.S.; BUSO. J.A. **Cultura de tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA v.1 p.183 - 260, 1998

HOPKINS, G.W. **Introduction to plant physiology**. 2°ed., New York City, Published by John Wiley & Sons, Inc., 1999.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Guanabara Koogan, 2008. 472p.

KOLBERK, J.; ALVES, R.J.V. Impacts of Cattle, Fire and Wind in Rocky Savannas, Southeastern Brazil. **Acta Universitatis Carolinae**, v.22, p. 111-130, 2008.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups**. 4 ed. Berlin: Springer, 2003, 513p.

LEITE, D.L.; PETERS, J.A.; NAKASU, B.H.D. Efeito de solidificantes sobre a multiplicação e crescimento de gemas de Pereira. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.5, v.1, p.47-49, 1993.

MURASHIGE. T.; SKOOG. F.A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **PhysiologiaPlantarum**, v.15, p. 473-479, 1962.

NEVES, S.P.S; CONCEIÇÃO, A.A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. **Acta Botânica Brasilica**. v.24, n.3, p. 697-707, 2010.

OLIVEIRA, E.S. **Gaseificação da macaúba**. 2008, 83p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, BA

OLIVEIRA, R.C.S. **Uso e conservação do candombá (*Vellozia sincorana*), planta endêmica da Chapada Diamantina**. 2013, 86p., Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA.

PAIVA, P.D.O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação *in vitro* de Crisântemo. **Revista Ceres**, v.46, n.264, p.141-148, 1999.

PEIXOTO, P.H.P; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: Efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, v.42, n. 242, p. 431-443, 1995.

REZENDE, J.C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S.P.; PEREIRA, A.R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentrações de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v.9, n.1, p.21-26, 2005.

SÁ, P.F.; SÁ, O.C.; SÁ, L.J.; AMORIM, E.A.J.; MENEZES, A.S.T.; LÉDO, S.A.; Desenvolvimento inicial *in vitro* de gliricídia em diferentes níveis de salinidade. **Scientia Plena**, v.10, n.4, 2014.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 9, 2007.

SOARES, W.S.; RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BARROSO, P.A.; NASCIMENTO, K.S.; FERREIRA, K.T. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.esp., p.138-142, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3° Ed. Porto Alegre. 2009, 819p.

VIANA, J.O.F.; **Indução e seleção de linhagens celulares de *Eucalyptus urophylla* para tolerância aos estresses hídricos e térmicos**. 2005, 68p., Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Piracicaba.

WARG, W.; VINORCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1 p. 1-14, 2003.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAFA, M.; FOOLAD.; M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v.6, p.199-223, 2007.