



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA
DE SANTANA**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



ANDRESSA PRISCILA PIANCÓ SANTOS LIMA

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Orthophytum
mucugense* WAND. E CONCEIÇÃO**

FEIRA DE SANTANA - BAHIA

2016

ANDRESSA PRISCILA PIANCÓ SANTOS LIMA

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
Orthophytum mucugense WAND. E CONCEIÇÃO**

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
Co-orientadora: Prof. Dra. Alone Lima Brito

FEIRA DE SANTANA - BAHIA

2016

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani
(Universidade Federal da Bahia)


Profa. Dra. Franciane Tavares Braga
(Universidade do Estado da Bahia)


Profa. Dra. Alone Lima Brito
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Coorientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2016

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

L696m Lima, Andressa Priscila Píancó Santos
Micropropagação e conservação *in vitro* de *Orthophytum mucugense*
Wand. e Conceição / Andressa Priscila Píancó Santos Lima. – Feira de
Santana, 2016.
92 f. : il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.
Coorientadora: Alone Lima Brito.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2016.

1. *Orthophytum mucugense* – Cultura *in vitro* – Chapada Diamantina,
BA. I. Santana, José Raniere Ferreira de, orient. II. Brito, Alone Lima,
coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.564(814.22)

Às minhas amadas

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir mais esta etapa em minha vida.

À minha família (meus pais, irmãos, minha vó e tios) pelo apoio, incentivo, pela ajuda, preocupação, paciência e compreensão.

À minha mãe e irmã pelo carinho e pelas palavras nos momentos de tensão, por me darem força, inspiração e pela confiança.

À vó Noélia e tia Liu pelas orações, pelas palavras de fé.

À Alone por toda atenção, dedicação e contribuições para a realização deste trabalho, pela sua amizade, incentivo e ensinamentos.

Ao professor José Raniere pelas oportunidades dadas desde a iniciação científica, e por sua orientação e ensinamentos.

Aos colegas do LCTV pela convivência harmoniosa, pelas contribuições, e por todos os momentos divertidos nesse período. À Flavia pela companhia na viagem de campo. À Mara Márcia pela amizade, e por compartilhar o conhecimento durante a minha iniciação científica.

À Jéssica, Bárbara e Emile pela amizade construída, pelos momentos de convivência, pelas risadas, pela ajuda, pelos aprendizados compartilhados. Já sinto saudades.

À Jéssica pelo incentivo, pela confiança, preocupação e disponibilidade de sempre, por estar presente em todos os momentos, pelas “brincas” e conselhos, por escutar minhas lamurias e baboseiras, “ô curica...”.

À Bárbara pelo apoio, pela confiança, pelo seu jeito calmo e atencioso de ouvir e aconselhar, por estar presente nos momentos de alegrias e tristezas, por ouvir minhas loucuras e meus desesperos, e pelos puxões de orelha, “tome vergonha”. À Limão pela sua ajuda.

À Chelle e Moni pela amizade de sempre, pelo apoio, pelas “brincas”, por ouvirem meus desabafos, pelo incentivo e ajuda principalmente nos momentos de desânimo. À Chelle por compartilhar sua experiência, e pelas dicas.

Aos colegas da turma RGV 2014.1, à Marília, Uiliane, Juliana, Alex e Alírio pelos momentos compartilhados.

À Marília pela amizade desde o começo, por todos os momentos de estudo e distração, pela ajuda, pela companhia em campo, pelas trocas de informações, pelas palavras de apoio.

À Fernanda Bastos pelas contribuições na execução do trabalho, pela companhia divertida no laboratório.

À professora Marilza pela sua disponibilidade, e atenção.

A Romeu Leite e Tamara pela ajuda. Á Romeu pela sua contribuição e amizade.

Ao Projeto Sempre-viva pela receptividade, em especial a Nilton e Edmundo pela ajuda na coleta das sementes.

Aos meus amigos iluminados por todo apoio e incentivo de sempre.

A todos que contribuíram de algum modo para realização deste trabalho, Obrigada.

RESUMO

A Chapada Diamantina – BA apresenta espécies endêmicas com potencial ornamental dentre as quais está a *Orthophytum mucugense*, que ocorre no município de Mucugê. Esta espécie é alvo de extrativismo e considerada como vulnerável, sendo necessários estudos de propagação e conservação da mesma. Portanto, objetivou-se neste trabalho estabelecer protocolos de micropropagação e conservação *in vitro* de *O. mucugense*. Para isto foram avaliadas as respostas morfogênicas em três tipos de explantes, caulinar, radicular e foliar, sob efeito de diferentes concentrações dos reguladores vegetais ANA, 2,4-D e BAP. Foram obtidas formação de brotos em explante caulinar por organogênese direta, em explante foliar basal por organogênese indireta e formação de calo em explante foliar basal e radicular. O enraizamento dos brotos foi realizado com 1 g.L⁻¹ de carvão ativado por 30 dias, e as microplantas aclimatizadas em casa de vegetação com exposição direta ao ambiente. Estes dados demonstram que a cultura de tecidos é uma ferramenta viável para a propagação *in vitro* de *O. mucugense*. Na conservação *in vitro* foram testados o efeito da redução de sais do meio, de agentes osmóticos e do retardante ancymidol no crescimento mínimo das plantas; após 300 dias de cultivo foram realizadas análises de crescimento das mesmas, do teor de clorofila e da capacidade regenerativa. Com base nestas avaliações o ancymidol, nas concentrações utilizadas, não é eficiente na indução do crescimento mínimo, e a redução de sais MS para 1/3 com a combinação de 45 g.L⁻¹ de sacarose com 7,8 g.L⁻¹ de manitol é indicada para conservação *in vitro* de *O. mucugense*.

Palavras-chave: Bromélia. Organogênese. Calogênese. Crescimento mínimo. Capacidade regenerativa.

ABSTRACT

Chapada Diamantina – BA presents endemic species with ornamental potential among which is *Orthophytum mucugense*, which occurs in the municipality Mucugê. This species is a target of extractivism and it is considered vulnerable, rendering studies of propagation and conservation of the species necessary. Therefore, the objective of this study was to establish protocols of micropropagation and *in vitro* conservation of *O. mucugense*. To that end, morphogenetic responses were evaluated in three types of explants, stem, root and leaf under the effect of different concentrations of the plant growth regulators NAA, 2,4-D and BAP. Sprouts formation in stem explants by direct organogenesis, in basal leaf explants by indirect organogenesis and callus formation in basal root and leaf explants were obtained. The rooting of the shoots was carried out with 1 coal g.L⁻¹ activated for 30 days, and microplants acclimatized in a greenhouse with direct exposure to the environment. These results evince that tissue culture is a viable tool for *in vitro* propagation of *O. mucugense*. In *in vitro* conservation the effect of the medium salts reduction, of osmotic agents and of the retardant ancymidol in the minimum growth of the plants were tested; after 300 days of cultivation, analysis of the plant growth, of the chlorophyll content and of the regenerative capacity were carried out. On the basis of these assessments, the ancymidol, in the concentrations used, is not efficient in minimal growth induction, and the reduction of MS salts to $\frac{1}{3}$, with the combination of 45 g.L⁻¹ of sucrose with 7.8 g.L⁻¹ of mannitol is indicated for *in vitro* conservation of *O. mucugense*.

Key-words: Bromeliad. Organogenesis. Callogenesis. Minimum growth. Regenerative capacity.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| REFÊRENCIAS | 16 |
| | |
| CAPÍTULO 1 – Respostas morfogênicas de <i>Orthophytum mucugense</i> Wand. e Conceição <i>in vitro</i> | 20 |
| Resumo | 21 |
| Abstract | 22 |
| Introdução | 23 |
| Material e métodos | 26 |
| Resultados e discussão | 30 |
| Conclusão | 50 |
| REFÊRENCIAS | 51 |
| | |
| CAPÍTULO 2 – Conservação <i>in vitro</i> de <i>Orthophytum mucugense</i> Wand. e Conceição <i>in vitro</i> | 57 |
| Resumo | 58 |
| Abstract | 59 |
| Introdução | 60 |
| Material e métodos | 63 |
| Resultados e discussão | 66 |
| Conclusão | 82 |
| REFÊRENCIAS | 83 |
| | |
| CONCLUSÃO GERAL | 86 |
| APÊNDICE A | 87 |
| APÊNDICE B | 89 |

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é detentor da maior cobertura de florestas tropicais, possui ampla extensão territorial, diversidade climática e geográfica, e por isso abriga uma grande diversidade biológica, sendo o principal país com megadiversidade do Planeta (BRASIL, 2002). Apresenta a flora mais rica do mundo abrigando mais de 56.000 espécies vegetais, o que representa cerca de 19% de toda flora mundial (GIULIETTI et al., 2005); e é considerado um dos países mais importantes em diversidade de Bromeliaceae, abrigando 40% das espécies conhecidas (TAMAKI et al., 2011).

A família Bromeliaceae é constituída por plantas típicas das zonas tropicais e subtropicais das Américas e ocorrem do Chile ao sul dos Estados Unidos, com exceção da *Pitcairnia feliciana* que ocorre exclusivamente no Golfo da Guiné, na África (LEME, 1984). Possui cerca de 3172 espécies e 58 gêneros (LUTHER, 2008), constitui-se geralmente de plantas terrestres, herbáceas, epífitas e saxícolas, e está dividida em três subfamílias, Tillandsioideae, Pitcairnioideae e Bromelioideae (WANDERLEY, 1990).

As bromélias, como são denominadas as plantas pertencentes a família Bromeliaceae, recebem várias denominações em diferentes regiões, sendo chamadas, por exemplo, de gravatá, caraguatá, caroá e macambira (LEME, 1984). Estas plantas possuem um desenvolvido reservatório de água na base das folhas, o que parece compensar em parte, o sistema radicular pouco desenvolvido (KERBAUY, 1997), servindo também como fonte de água e como recurso alimentar para espécies animais (VARASSIN; SAZIMA, 2000).

Além dessa importância ecológica, as bromélias são largamente utilizadas como plantas ornamentais devido a sua beleza de cores e formas, apresentando grande importância econômica entre as espécies ornamentais, sendo muito cultivada em vaso e usada em decoração de interiores e projetos paisagísticos; no entanto grande parte destas plantas é obtida de forma extrativista (RODRIGUES et al., 2007; ANACLETO; NEGRELLE, 2009) ocasionando perda genética.

Grande parte das espécies de bromélias brasileiras ocorre na Cadeia do Espinhaço, que é considerada a área mais importante de endemismo de Bromeliaceae, abrigando 62% de todos os taxa endêmicos (VERSIEUX; WENDT, 2007; VERSIEUX et al., 2008). Esta área é uma formação montanhosa que se estende do estado de Minas Gerais até a Bahia e é recoberta por vegetações de Mata Atlântica, Cerrado e da Caatinga que ocorre na altura do Parque Nacional da Chapada Diamantina - BA (VASCONCELOS; D' ANGELO NETO, 2007; SILVA et al., 2008).

A Chapada Diamantina abriga espécies endêmicas que apresentam grande potencial ornamental, dentre as quais se destaca a *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição (LEME, 1998; WANDERLEY; CONCEIÇÃO, 2006), inserida na subfamília Bromelioideae que é constituída por 29 gêneros, sendo que 21 ocorrem no Brasil e destes oito são endêmicos (WANDERLEY, 1990).

Orthophytum mucugense (Figura 1A; 1B) é uma espécie endêmica de Mucugê - BA, que ocorre em paredões rochosos verticais (Figura 2), em beira de rios e cachoeiras, constituindo locais sombreados e úmidos (WANDERLEY; CONCEIÇÃO, 2006). São plantas rupícolas, de caules curtos, folhas patentes ou arqueadas com bainhas foliares ovaladas, e margens serrilhadas com espinhos. As lâminas foliares são planas ou ligeiramente côncavas e linear-triangulares. Durante a antese estas lâminas ficam parcial ou completamente vermelhas. Possuem tricomas glandulares na base das superfícies abaxial. Suas inflorescências são sésseis e com muitas flores. Apresentam sépalos verdes e assimétricas, estreitamente triangulares, com tricomas glandulares, margens inteiras e ápice acuminado. Suas pétalas são brancas e linear-espatuladas (LOUZADA; WANDERLEY, 2010).



Figura 1- (A) *O. mucugense* em antese. Fonte: Bellintani (2006). (B) *O. mucugense* após a antese em ambiente natural. Fonte: Autora (2016).



Figura 2- *O. mucugense* em paredões rochosos. Rio Tiburtino, Parque Municipal de Mucugê (Projeto Sempre-Viva), Mucugê, Chapada Diamantina – BA. Fonte: Autora (2016).

Tendo em vista a importância ecológica e econômica desta espécie endêmica, associada à vulnerabilidade decorrente da restrita distribuição das mesmas, da ameaça pelas queimadas e do extrativismo predatório, e ainda do número reduzido de plantas produzidas pela propagação natural, torna-se necessário estudos que visem à propagação e conservação dessa espécie. A elaboração de técnicas para o cultivo de bromélias ornamentais é considerada uma importante estratégia para preservação de espécies visto que pode gerar maior produção de plantas para o mercado evitando a retirada de indivíduos da natureza (TAMAKI et al., 2011).

Diante disso, a cultura de tecidos surge como alternativa, já que esta ferramenta de êxito da biotecnologia permite o estabelecimento de protocolos de multiplicação *in vitro*, possibilitando a obtenção de plantas livres de patógenos, e a produção de mudas em larga escala para comercialização, o que evita o extrativismo e proporciona a conservação de germoplasma; considerando também que as mudas de plantas ornamentais e de flores são as mais produzidas no mundo por técnicas *in vitro* (CARVALHO et al., 2013).

Uma das técnicas da cultura de tecidos é a micropropagação, que demonstra importância potencial e prática nas áreas de horticultura, agricultura, e florestal, além da pesquisa básica (KERBAUY, 1997). Esta técnica oferece vantagens como a aquisição de maior número de

plantas em curto tempo, espaço reduzido, com qualidade fitossanitária, homogeneidade das mudas, e permite a obtenção de plantas geneticamente idênticas à matriz (SCARANARI; LEAL; PELLEGRINO, 2008; CARVALHO et al., 2013; SANTOS-SEREJO et al., 2013).

A micropropagação é dividida em fases, o estabelecimento *in vitro*, a multiplicação, o enraizamento e a aclimatização. Para o estabelecimento *in vitro* alguns critérios são considerados importantes, como a escolha do explante, do meio nutritivo mais adequado e do melhor método de assepsia do explante, visto que a contaminação é um dos principais problemas encontrados nesta fase (SOUZA; SCHUCH; SILVA, 2006; DINIZ et al., 2008; GOLLE et al., 2012).

Em seguida é realizada a fase da multiplicação que pode ocorrer por meio da organogênese ou embriogênese somática, os quais ocorrem por via direta ou indireta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Na organogênese os tecidos vegetais são induzidos a sofrer alterações que promovem a formação de primórdios vegetativos, que são estruturas unipolares nas quais o sistema vascular está ligado ao tecido do explante inicial (FARIA et al., 2007).

A via direta deste processo permite a multiplicação mantendo a identidade genética do indivíduo propagado, através do surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentem potencial morfogenético sem a formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Já na organogênese indireta há a necessidade de desdiferenciação do explante, originando calo antes do estabelecimento das células competentes (BERTOZZO; MACHADO, 2010).

Os calos são massas celulares indiferenciadas que tem facilidade na regeneração *in vitro* (KERBAUY, 1997), e possibilitam a obtenção de elevada taxa de multiplicação. Este sistema apresenta potencial para variabilidade genética (NIKAN; SHITOLE, 1999) e essas variações são, muitas vezes, desejadas para flores e plantas ornamentais, pois podem produzir variantes com cores diferentes, maior tamanho e/ou beleza estética (RIBEIRO et al., 2007).

Para que ocorra a morfogênese *in vitro* é necessário que haja sinalização específica por reguladores de crescimento (GUERRA; NODARI, 2006), que agem de modo a alterar a fisiologia e morfologia da planta, o que pode ocasionar modificações qualitativas e quantitativas na produção (MARTINS; CASTRO, 1999). A formação de órgãos nas plantas dependem do balanço entre citocinina e auxina (KERBAUY, 1997), que podem promover a formação de raízes, parte aérea ou calo.

As auxinas atuam na formação de calos, indução do desenvolvimento de nós e de raízes adventícias, e dentre as mais utilizadas estão o ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butírico, o ácido naftaleno acético, e o 2,4-diclorofenoxiacético muito usado na indução de calo; já as

citocininas são utilizadas para estimular a divisão celular, formação de brotos adventícios e o desenvolvimento de gemas axilares, sendo as mais usadas a benzilaminopurina, zeatina e kinetina (CARVALHO; VIDAL, 2003).

Após a regeneração segue a fase de enraizamento *in vitro* que se caracteriza pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação. Este processo de enraizamento inclui fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos que interagem com os fatores ambientais (BOSA et al., 2003), e é influenciado pela composição do meio de cultura utilizado, como o tipo e as concentrações de auxinas adicionadas; já que o excesso destas pode ser tóxica para o alongamento das raízes (RADMANN; FACHINELLO; PETERS, 2002). O carvão ativado também tem sido utilizado no enraizamento *in vitro*, pois tem a capacidade de adsorver substâncias inibidoras do enraizamento, bem como substâncias tóxicas presentes no meio de cultura, além de diminuir a intensidade luminosa na região onde as raízes são formadas, o que beneficia este processo (ASSIS; TEXEIRA, 1998).

Um método eficiente de produção de raízes resulta em plantas com qualidade fisiológica e redução da perda destas ao longo da aclimatização (DAMIANI, SCHUCH, 2009). Esta consiste na última fase da micropropagação e trata dos processos de transferência da planta do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, passando por adaptação climática. É um processo de mudança drástica para as microplantas já que no ambiente *in vitro* há limitação de luz, de trocas gasosas, e grande disponibilidade de açúcar, e no ambiente *ex vitro* há necessidade de mudança deste estado heterotrófico para autotrófico, o que envolve grande gasto de energia (GUERRA; NODARI, 2006).

Além disso, as plantas cultivadas *in vitro* apresentam mesófilo pouco desenvolvido, cutícula fina e estômatos pouco funcionais o que leva à elevada perda de água quando transferidas para o ambiente *ex vitro* (KHAN et al, 2003), sendo necessário o uso de estratégias na aclimatização para o controle da umidade e que oferecem condições para uma maior sobrevivência das plantas (HAZARIKA, 2006).

O estabelecimento *in vitro* de *O. mucugense* foi realizado com sucesso (BELLINTANI et al., 2007) bem como a multiplicação via organogênese direta (BELLINTANI et al., 2008; LIMA et., al 2012); os autores concluíram que a cultura de tecidos é viável para a produção de brotos desta espécie de bromélia, entretanto sugerem que sejam realizados outros estudos para obtenção de uma maior taxa proliferativa.

Além da produção de plantas em larga escala as técnicas de cultura de tecidos constituem uma opção para a conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. Um dos métodos de conservação *in vitro* é a indução do crescimento mínimo que se baseia na redução do

metabolismo da planta sem causar prejuízo à sua viabilidade (LEMOS et al., 2002). Esta indução pode ser realizada por meio da diminuição da temperatura de incubação, pela adição de agentes osmóticos e retardantes de crescimento ao meio de cultura (CANTO, 2004), e também pela redução de sais do meio; sendo que o método de crescimento mínimo permite a permanência das culturas em subcultivos prolongados, reduzindo o custo de manutenção (MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010).

O manitol e a sacarose são algumas das substâncias utilizadas para aumentar o potencial osmótico do meio de cultura (SOUZA, 1988). Esses agentes osmóticos quando adicionados ao meio reduzem a absorção de água e minerais pelas células, e conseqüentemente limita o crescimento das plantas (SOUZA et al. 2009).

O ancymidol é um dos retardantes de crescimento utilizados na conservação *in vitro*. Este regulador age inibindo uma reação oxidativa na biossíntese da giberelina (SHIVE; SISLER, 1976), e exerce sua influência por inibir as divisões celulares e subsequente aumento das células, sem causar deformações ou danos à planta (JARRET, 1997).

No que se refere à conservação de *O. mucugense* não há relatos na literatura de trabalhos de conservação *in vitro* o que sugere a necessidade de estudos neste sentido, visto que esta espécie endêmica se encontra em situação de vulnerabilidade.

O desenvolvimento de protocolos de propagação e conservação *in vitro* desta espécie irá propiciar a produção de mudas em larga escala e a conservação *ex situ*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos de micropropagação e conservação *in vitro* para *O. mucugense*.

REFERÊNCIAS

- ANACLETO, A.; NEGRELLE, R. R. B. Extrativismo de rametes e propagação vegetativa de *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb.(Bromeliaceae). **Scientia agraria**, v. 10, n. 1, p. 85-88, 2009.
- ASSIS; T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI, v.1, p. 183-260. 1998.
- BELLINTANI, M. C. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1101-1103, jul. 2007.
- BELLINTANI, M.C. et al. Resposta regenerativa *in vitro* de explantes caulinares de bromélias endêmicas da Chapada Diamantina– Bahia. **Magistra**, v.20, n.4, p.328-337, 2008.
- BERTOZZO, F., MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.
- BOSA, N.; CALVETE, E. O.; NIENOW, A. A.; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p.207-210, abril-junho 2003.
- BRASIL.**Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2002.
- CANTO, A. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.
- CARVALHO et al. In: JUNGHANS, T. G; SOUZA, A da S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2ed. Ver. E ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2013.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Campina Grande, 2003.
- DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Different substrates and environment conditions on *in vitro* rooting of blueberry. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 563-566, 2009.
- DINIZ, J. D. N. et al. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 1, p. 107-113, 2008.
- FARIA, G. A. et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, p. 535-543, 2007.
- GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, 2005.

GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

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, v.1, p. 183-260. 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. Edição da Steinmacher, 2006.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

JARRET, L. R. Effects of Chemical Growth Retardants on Growth and Development of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*. **J Plant Growth Regul** n. 16, p. 227–231, 1997.

KERBAUY, G. B. Clonagem de Plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 1997.

KHAN, P. S. S. V. *et al.* Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

LEME, E. M. C. A beleza selvagem das bromélias brasileiras. **Revista Geográfica Universal**, n. 20, p. 60-66, Nov. 1984.

LEME, E.M.C., Bromélias da Mata Atlântica. **Canistropsis** Rio de Janeiro:Salamandra, 143p, 1998.

LEMOS, E. E. P. de et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária brasileira, Brasília**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LIMA, C. O. de C. et al. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense* Direct organogênese. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.2, p.249-254, fev, 2012.

LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. das G. L. Revision of *Orthophytum* (Bromeliaceae): the species with sessile inflorescences. **Phytotaxa** 13, 2010.

LUTHER, H. E. Na alphabetical list of bromeliad binomials. **Bromeliad Society International**, ed. 11, 2008.

MARTINS, M. B. G.; CASTRO, P. R. C. Efeitos de giberilina e ethephon na anatomia de plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.10, p.1855-1863, 1999.

MOOSIKAPALA, L.; TE-CHATO, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, v. 6, n. 2, p. 401-407, 2010.

NIKAN, T.D.; SHITOLE, M.G. *In vitro* culture of Safflower L. cv. Bhima: initiation, growth optimization and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.55, p.15-22, 1999.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 03, p. 624-628, 2002.

RIBEIRO, M. de F. et al. Calogênese em *Dieffenbachia* sp.: Resposta aos reguladores de crescimento ANA e BAP. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 51-53, jul. 2007.

RODRIGUES, I.M.C. et al . Ocorrência de plantas daninhas no cultivo de bromélias. **Planta daninha**, Viçosa , v. 25, n. 4, Dec. 2007.

SANTOS-SEREJO, J. A. dos et al. Micropropagação da Bananeira.In: JUNGHANS, T. G; SOUZA, A da S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2ed. Ver. E ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2013.

SCARANARI, C.; LEAL, P. A. M.; PELLEGRINO, G. Q. Estudo de simulações de microclimas em casas de vegetação visando à aclimatação de mudas micropropagadas de bananeira cv Grande Naine. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 1001-1008, 2008.

SHIVE, J. B.; SISLER, H. D. Effects of ancymidol (a growth retardant) and triarimol (a fungicide) on the growth, sterols, and gibberellins of *Phaseolus vulgaris* (L.). **Plant Physiology**, v. 57, n. 4, p. 640-644, 1976.

SILVA, J. de A. et al. Identificação de áreas insubstituíveis para conservação da Cadeia do Espinhaço, estados de Minas Gerais e Bahia, Brasil. **Megadiversidade**, v. 4, p. 272-309, 2008.

SOUZA, A da S. et al. Preservação de Germoplasma Vegetal, com Ênfase na Conservação *in vitro* de Variedades de Mandioca. **Circular Técnica**. Cruz das Almas, Ba, 2009.

SOUZA, E. L. S. Conservação de Germoplasma *in vitro*. In: Encontro sobre recursos genéticos. **Anais**. Jaboticabal, 1988.

SOUZA, J. A. de; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. da. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. **Ciência rural**, v. 36, n. 6, p. 1920-1922, 2006.

TAMAKI, V. et al. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. **O Mundo da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 91-97, 2011.

VARASSIN, I. G.; SAZIMA, M. Recursos de Bromeliaceae utilizados por beija-flores e borboletas em Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 11, n. 12, p. 57-70, 2000.

VASCONCELOS, M. F.; D'ANGELO NETO, S. Padrões de distribuição e conservação da avifauna na região central da Cadeia do Espinhaço e áreas adjacentes, Minas Gerais, Brasil. **Cotinga**, v. 28, p. 27-44, 2007.

VERSIEUX, L. M. et al. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 98-110, 2008.

VERSIEUX, L. M.; WENDT, T. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 11, p. 2989-3009, 2007.

WANDERLEY, M. das G. L. Diversidade e distribuição geográfica das espécies de *Orthophytum* (Bromeliaceae). **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.4, n.1, p. 169-175, 1990.

WANDERLEY, M. das G. L.; CONCEIÇÃO, A. A. Notas Taxonômicas e uma nova espécie do gênero *Orthophytum* Beer (Bromeliaceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitentibus** (Série Ciências Biológicas), Feira de Santana, v. 6, n. 1, p.3-8, 2006.

CAPÍTULO I

RESPOSTAS MORFOGÊNICAS DE *Orthophytum mucugense* WAND. E CONCEIÇÃO *IN VITRO*

RESUMO

Orthophytum mucugense é uma bromélia endêmica do município de Mucugê na Chapada Diamantina - BA, e por conta deste endemismo restrito, do extrativismo predatório, e por se apresentar em pequenas populações é classificada como vulnerável; sendo necessários estudos de propagação da mesma, que podem ser realizados utilizando a cultura de tecidos vegetais. Para isto foram avaliadas as respostas morfogênicas de diferentes explantes sob o efeito da BAP combinada com ANA ou 2,4-D visando estabelecer um protocolo de micropropagação para a espécie. A auxina ANA sobre explantes caulinares promoveu a formação de brotos via organogênese direta com taxa 98,66% para porcentagem de explante com broto e média 7,43 para número de brotos por explante. Estes brotos foram enraizados por 30 dias em tubos contendo meio de cultura acrescido de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado fechados com PVC, e as microplantas aclimatizadas em substrato de terra e vermiculita (1:1) com exposição direta ao ambiente *ex vitro* da casa de vegetação. Sob o efeito de BAP e ANA os explantes foliares basal apresentaram formação de brotos via organogênese indireta com 46,40% de explantes com calo, 43% de explantes com broto e 1,38 número de brotos por explante. A utilização de BAP combinada com 2,4-D induziu maior formação de calo em explante foliar basal, enquanto no explante radicular o uso isolado dessa auxina foi mais significativo; em ambos os explantes foi observado o surgimento de áreas meristemáticas, porém não houve regeneração de brotos. Sugere-se a realização de estudos que testem a capacidade regenerativa destes calos.

Palavras-chaves: Micropropagação. Organogênese. Calogênese. Bromélia.

ABSTRACT

Orthophytum mucugense is an endemic bromeliad from the municipality Mucugê in Chapada Dimantina – BA and because of its restricted endemism, of the predatory extractivism and for presenting itself in small populations, it is classified as vulnerable; this makes the studies about the propagation of the bromeliad necessary, which may be conducted using plant tissue culture. To that end, morphogenetic responses of different explants under the effect of BAP in combination with NAA or 2,4-D were evaluated in order to establish a micropropagation protocol for the species. The NAA auxin on stem cuttings explants promoted the formation of buds via direct organogenesis with 98.66% rate to a percentage of explants with sprouts and average 7.43 for number of shoots per explant. These shoots were held for 30 days in test tubes containing culture medium plus 1 gL⁻¹ of activated charcoal sealed with PVC, and microplants acclimatized in substrate of soil and vermiculite (1:1) with direct exposure to ex vitro environment of the greenhouse. Under the effect of BAP and NAA the basal leaf explants presented formation of shoots via indirect organogenesis with 46.40% of explants with callus, 43% of explants with shoots and 1,38 number of shoots. The use of BAP combined with 2,4-D induced higher callus formation in basal leaf explants, while in the root explant the isolated use of this auxin was more significant; in both explants the emergence of meristematic areas was observed, however, there was no regeneration of shoots. Studies to test the regenerative capacity of these calluses are suggested.

Key-words: Micropropagation. Organogenesis. Callogenesis. Bromeliad.

INTRODUÇÃO

A Família Bromeliaceae se constitui por cerca de 3172 espécies distribuídas em 58 gêneros (LUTHER, 2008), se destaca pela importância de suas espécies ornamentais, que podem ser rupícolas, terrestres ou epífitas e compõe diferentes formações vegetais (VERSIEUX et al., 2008).

O Brasil é considerado o centro de diversidade de bromélias, abrigando aproximadamente 50% das espécies conhecidas, as quais ocorrem em quase todos os ambientes, do nível do mar aos elevados altiplanos, em locais úmidos como a Mata Atlântica ou regiões áridas como a Caatinga (ZANELLA, 2009).

Das espécies brasileiras de Bromeliaceae, uma grande concentração ocorre na Cadeia do Espinhaço, sendo que esta área apresenta 26 gêneros e 224 espécies, com 111 endêmicas; e no estado da Bahia se encontram 106 espécies de bromélias subordinadas a 19 gêneros (VERSIEUX et al., 2008). Dentre estes gêneros se encontra o *Orthophytum* que é composto por cerca de 60 espécies restritas ao Brasil, sendo encontradas em estados do sudeste e nordeste incluindo a Bahia (LOUZADA; WANDERLEY, 2011) onde se encontra a espécie em estudo, *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição.

Esta espécie é endêmica da Chapada Diamantina – Ba, ocorre em rochas próximas a rios e cachoeiras, e por ter um endemismo restrito, ocorrendo apenas no município de Mucugê, e apresentar populações pequenas, é considerada ameaçada (LOUZADA; WANDERLEY, 2010). Além disso, é alvo de extrativismo o que a torna ainda mais vulnerável, sendo necessários estudos de propagação e conservação da mesma (LIMA et al., 2012).

Neste contexto, a cultura de tecidos vegetais pode ser uma alternativa viável para a propagação de *O. mucugense*. Visto que tem sido utilizada para a multiplicação de espécies ameaçadas de extinção (LIMA-BRITO et al., 2011), bem como para a conservação *ex situ* de genótipos de bromélias (LIMA et al., 2012).

A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos amplamente difundida que possibilita obter várias plantas a partir de um único explante, produzir mudas saudáveis em qualquer época do ano, em tempo e espaço reduzidos, e multiplicar espécies vegetais que não se propagam facilmente por métodos convencionais (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005; ERIG; SCHUCH, 2005).

Há quatro etapas sequenciais que constituem a micropropagação: o estabelecimento, a multiplicação, o enraizamento e a aclimatização. O estabelecimento *in vitro* se inicia com a escolha do explante mais adequado, do meio de cultura e do melhor método de desinfestação

desse explante (FERREIRA; SANTOS; BRAGADO, 2009; COSTA; NEPOMUCENO; SANTANA, 2010; GOLLE et al., 2012) já que a contaminação bacteriana e fúngica é um dos problemas ocorrentes nessa fase inicial do cultivo *in vitro* (LONDE et al., 2007).

A multiplicação *in vitro* tem como principal objetivo a produção de grande número de plantas em menor tempo possível, considerando os aspectos qualitativos das estruturas originadas (CHAVES, SCHUCH; ERIG, 2005). Esta etapa pode ser desenvolvida através da organogênese ou embriogênese, as quais ocorrem por duas vias distintas: a direta e a indireta. Na organogênese via indireta o explante inicial é induzido à formação de calo que posteriormente regenera gemas adventícias (PINHEIRO et al., 2009), já na via direta as gemas surgem diretamente do tecido do explante que possui potencial morfogênético (ARENHART; ZAFFARI, 2008).

A capacidade de regeneração *in vitro* pode ser influenciada pelo explante utilizado (PEREIRA et al., 2005) portanto, deve-se ponderar a diferenciação do tecido e a finalidade da micropropagação, pois apesar de qualquer tecido ter a capacidade de ser usado como explante baseado no princípio da totipotência das células vegetais, busca-se selecionar aqueles que apresentam maior quantidade de tecido meristemático; os explantes oriundos de plântulas, por exemplo, apresentam capacidade de crescimento, são responsivos à aplicação de reguladores vegetais e em sua maioria são livres de contaminantes, sendo vantajosos para a propagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Além disso, a regeneração é controlada, dentre outros fatores, pelo tipo e concentração dos reguladores vegetais utilizados, sendo a interação entre auxina/citocinina importante nesse processo (MORALES et al., 1999; COSTA; ALOUFA, 2006; SOARES et al., 2011).

Dentre os reguladores mais utilizados na cultura de tecidos estão as citocininas: benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), thidiazuron (TDZ), e as auxinas: ácido naftaleno acético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB) e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (GUERRA; NODARI, 2006). As citocininas promovem a formação de gemas adventícias e induzem, na presença de auxinas, a divisão celular em calos, enquanto as auxinas atuam no alongamento celular, divisão celular em cultura de calos, e formação de raízes adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2013), podendo atuar no enraizamento *in vitro*.

A etapa de enraizamento depende de diversos fatores endógenos e exógenos e da interação entre eles (ROCHA et al., 2008). Dentre esses fatores estão o tipo de meio de cultura e de auxina utilizados, e suas concentrações (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009), a juvenilidade e genótipo da planta matriz, a presença de carboidratos e de outras substâncias

como o carvão ativado, que tem sido usado para estimular o enraizamento quando adicionados ao meio de cultura (SOUZA; PEREIRA, 2007).

A presença de raízes é importante para o crescimento e sobrevivência das plantas, sobretudo na aclimatização (ROCHA et al., 2008) na qual a planta passa por um processo de adaptação climática por ser transferida para um novo ambiente (MORAES; CALVACANTE; FARIA, 2002). A aclimatização é uma etapa decisiva para o sucesso da micropropagação, pois pode ocorrer perda de vigor e mortalidade das plantas devido ao dessecamento e a alteração da condição heterotrófica (*in vitro*) para autotrófica (*ex vitro*) (CATUNDA et al., 2008; LIMA-BRITO et al. 2016). Devido a isto algumas espécies precisam de um período de pré-aclimatização chamado de rustificação; no qual as microplantas são gradualmente expostas às condições externas, com controle da umidade e luminosidade (BATAGIN et al., 2009). Além disso, fatores como a fitossanidade e nutrição são essenciais, o que torna necessário que a planta ocupe um substrato que lhe ofereça boas condições de desenvolvimento (MORAES; CAVALCANTE; FARIA, 2002).

Há relatos na literatura de trabalhos com o cultivo *in vitro* de *O. mucugense* como estabelecimento *in vitro* (BELLINTANI et al., 2007) e multiplicação via organogênese direta (BELLINTANI et al., 2008 e LIMA et al., 2012) utilizando os reguladores ANA e BAP combinados e em baixas concentrações, com maiores taxas de multiplicação obtidas a partir de explantes caulinares. No entanto, os autores consideram estas taxas baixas e sugerem que novas pesquisas sejam realizadas a fim de aumentar a taxa proliferativa.

Isto pode ser feito pela utilização de diferentes concentrações e reguladores vegetais, e por estudos de organogênese indireta, que ainda não foram relatados para esta espécie, já que possivelmente a via indireta aumenta a regeneração de brotos devido a sua fase intermediária que gera inúmeras células a partir de um único explante, e conforme preconiza a totipotência vegetal cada célula tem a capacidade de originar um novo indivíduo.

Além disso, deve-se testar outros tipos de explante, visto que a regeneração a partir de diferentes explantes oriundos de uma única planta pode maximizar a taxa de multiplicação *in vitro*.

Neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes concentrações da citocinina BAP e das auxinas 2,4-D e ANA na resposta morfogênica de diferentes tipos de explantes de *Orthophytum mucugense*, a fim de estabelecer um protocolo de micropropagação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Desinfestação e germinação *in vitro*

Para obtenção do material vegetal foram utilizadas sementes de *Orthophytum mucugense* coletadas no Parque Municipal de Mucugê, em Mucugê – Bahia. No processo de desinfestação as sementes foram imersas em álcool 70% por um minuto e em seguida em hipoclorito de sódio 3% por 15 minutos e decorrido este tempo, as mesmas foram lavadas por quatro vezes em água destilada autoclavada. Após a desinfestação, procedeu-se a semeadura em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Todo o processo de desinfestação e semeadura foi realizado conforme metodologia descrita por Bellintani (2006).

Meio de cultura

Para todos os experimentos o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade das concentrações salinas (MS ½) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e gelificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, distribuído em tubos de ensaio (25x150mm). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e a esterilização do mesmo foi realizada em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Organogênese direta

Experimento I: Efeito do BAP e ANA em explantes caulinares de *O. mucugense*

Explantes caulinares, com 0,5 cm de comprimento, oriundos de plantas germinadas *in vitro*, com cinco meses de idade, foram inoculados em tubos contendo 15 mL do meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina – BAP (0,00; 6,66; 8,88; 11,10; 13,20 µM) e ácido naftaleno acético - ANA (0,00; 2,60; 5,20 µM).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de 5 x 3, sendo cinco concentrações de BAP e três de ANA, totalizando 15 tratamentos, com cinco repetições por tratamento e três amostras por repetição. Cada amostra continha um explante.

Após 60 dias da montagem, foram avaliadas as variáveis, porcentagem de explantes com brotos (%EB), número de brotos por explante (NBE), e porcentagem de explantes com calo (%EC).

Os brotos obtidos foram transferidos para meio livre de regulador vegetal para alongamento, onde permaneceram por 60 dias até obterem uma média de 2 cm de comprimento.

Experimento II: Enraizamento *in vitro*

Os brotos alongados, com 2 cm de comprimento, foram inseridos em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura acrescido de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado (BELLINTANI et al., 2007).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos: enraizamento por 30 e 60 dias. Cada tratamento continha 20 repetições e duas amostras por repetição, sendo cada uma composta por um explante.

Após o tempo estipulado foram avaliados a porcentagem de explantes enraizados (%EE), o número de raízes (NR) e o comprimento da maior raiz (CMR). Em sequencia essas microplantas foram aclimatizadas.

Experimento III: Aclimatização

As microplantas enraizadas *in vitro* foram transplantadas para substrato de terra e vermiculita (1:1) (Bellintani et al., 2007) em copos plásticos de 200 ml do tipo descartável transparente. Ao serem transplantadas 50% das microplantas de cada tratamento da etapa de enraizamento foram cobertas por copos descartáveis transparentes e 50% ficaram diretamente expostas ao ambiente da casa de vegetação.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 2 x 2, sendo dois tempos de enraizamento (30 ou 60 dias) e dois tipos de exposição na aclimatização (cobertas ou diretamente expostas), totalizando quatro tratamentos cada um composto por 20 repetições e uma amostra por repetição. T1 – 30 dias de enraizamento e diretamente expostas; T2 – 30 dias de enraizamento e cobertas; T3 – 60 dias de enraizamento e diretamente expostas; T4 – 60 dias de enraizamento e cobertas.

Após o transplântio das microplantas os copos permaneceram em bandeja de plástico com uma lâmina de água (400 ml) em casa de vegetação, e 10 dias depois os copos que cobriam as amostras foram retirados e o substrato irrigado diariamente. Decorridos 120 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

Organogênese indireta

Experimento IV: Efeito do BAP e ANA em explantes foliares de *O. mucugense*.

Explantes foliares basais com 1 cm de comprimento, oriundos de plantas germinadas *in vitro*, com quatro meses de idade, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,00; 6,66; 8,88; 11,10; 13,20 µM) e ANA (0,00; 2,60; 5,20 µM).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de 5 x 3, sendo cinco concentrações de BAP e três de ANA, totalizando 15 tratamentos, com cinco repetições por tratamento e cinco amostras por repetição. Cada amostra continha um explante.

Experimento V: Efeito do 2,4-D e BAP em explantes foliares e radiculares de *O. mucugense*

Os explantes foliares (segmento apical, segmento mediano e segmento basal) e radiculares com 1 cm de comprimento, obtidos de plantas germinadas *in vitro*, com cinco meses de idade, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de 2,4 diclorofenoxiacético – 2,4-D (0,00; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 μM) e BAP (0,00; 2,5; 5,0 μM).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de 4 x 5 x 3, sendo quatro tipos de explantes, cinco concentrações de 2,4D e três de BAP, totalizando 60 tratamentos, com cinco repetições por tratamento e cinco amostras por repetição. Cada amostra continha um explante.

Para ambos os experimentos, após 60 dias da montagem, foram avaliadas as variáveis porcentagem de explantes com calo (%EC), coloração e textura dos calos, porcentagem de explantes com brotos (%EB) e número de brotos por explante (NBE).

Após análise, os calos obtidos no experimento V foram transferidos para meio de cultura livre de regulador vegetal e após 60 dias foram avaliadas a presença de área meristemática (PAM) caracterizada por área verde nos calos (Figura 1), porcentagem de explantes com brotos (%EB) e número de brotos por explante (NBE).

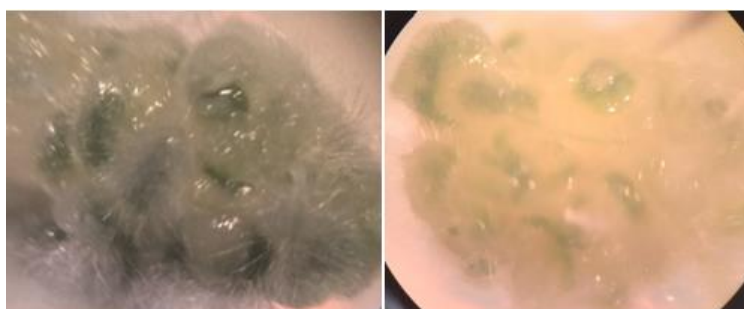


Figura 1. Área meristemática em calos de *O. mucugense*. Fonte: Autora (2016).

Condições de cultivo

Nos experimentos I e II as culturas foram mantidas em sala de crescimento sobre temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e nos experimentos IV e V foram mantidas no escuro sobre as mesmas condições de temperatura.

Análise Estatística

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Organogênese direta

A resposta morfogênica observada nos explantes caulinares foi a formação de brotos por organogênese direta, não ocorreu formação de calos nos tratamentos testados (Figura 2).



Figura 2. Respostas morfogênicas de explantes caulinares de *O. mucugense* sob efeito de BAP e ANA após 60 dias de cultivo *in vitro*. Fonte: Autora (2016).

A análise de variância demonstrou que a interação BAP x ANA não foi significativa para nenhuma das variáveis analisadas, no entanto, houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) isolado desses reguladores (Tabela 1 do apêndice A). A citocinina BAP apresentou efeito isolado altamente significativo ($p \leq 0,01$) para número de brotos por explante (NBE), e a auxina ANA indicou efeito isolado altamente significativo tanto para %EB, quanto para NBE (Tabela 1 do apêndice A).

Para a %EB as médias dos tratamentos testados na presença desta auxina, que foram de 97,33% e 98,66%, nas concentrações de 2,60 μM e 5,20 μM , respectivamente, não diferiram estatisticamente entre si, mas foram significativamente superiores a média do controle (77,33%) para a %EB (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de explantes com broto (%EB) e número de brotos por explante (NBE) em função das concentrações de ANA em explantes caulinares de *Orthophytum mucugense* após 60 dias de cultivo.

| Variáveis | ANA μM | | |
|-----------|-------------------|---------|---------|
| | 0,00 | 2,60 | 5,20 |
| %EB | 77,33 b | 97,33 a | 98,66 a |
| NBE | 3,30 b | 6,42 a | 7,43 a |

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados para %EB a partir do explante caulinar com 5 meses, cuja menor média foi de 77,33%, são superiores aos obtidos por Bellintani et al. (2008) e Lima et al. (2012) que trabalhando também com *O. mucugense* apresentaram, respectivamente, uma taxa de 39% para explante caulinar com 6 meses de idade e 56,67% para explante caulinar com 40 dias de idade, ambos utilizando uma combinação de BAP e ANA. Os resultados encontrados por estes autores podem estar relacionados as baixas concentrações dos reguladores utilizadas.

Para o NBE as duas concentrações de ANA utilizadas (2,60 μM e 5,20 μM) apresentaram médias (6,42 e 7,43, respectivamente) que não diferiram estatisticamente entre si, porém diferiram do controle cuja média foi de 3,30 (Tabela 1). Santa-Rosa et al. (2013) também obtiveram formação de brotos a partir de explantes caulinares de *Aechmea distichantha* utilizando o regulador ANA, sendo que a maior concentração utilizada (0,5 μM) promoveu a maior média. Já Mendes et al. (2007a) utilizaram explantes caulinares de *Billbergia distachia* e alcançaram uma média de 5,3 brotos na combinação de 5 μM de BAP e 3 μM de ANA, inferior as médias obtidas neste estudo na presença de ANA. Silveira et al. (2009a) testaram concentrações de ANA combinadas com BAP ou KIN em brotos de *Neoglaziovia variegata* e obtiveram maior média na combinação de 0,5 μM de ANA com 4,4 μM de BAP, divergindo deste trabalho no qual não houve interação entre os reguladores.

Em relação ao efeito do BAP sobre o NBE a análise de regressão apresentou o modelo polinomial quadrático como mais representativo para esta variável; demonstrando que o acréscimo de regulador ao meio de cultura promoveu um aumento no número de brotos atingindo o ponto máximo na concentração de 8,92 μM , com valor estimado de 6,89 brotos por explantes. A partir deste ponto o aumento da concentração de BAP causou diminuição da formação brotos (Figura 3).

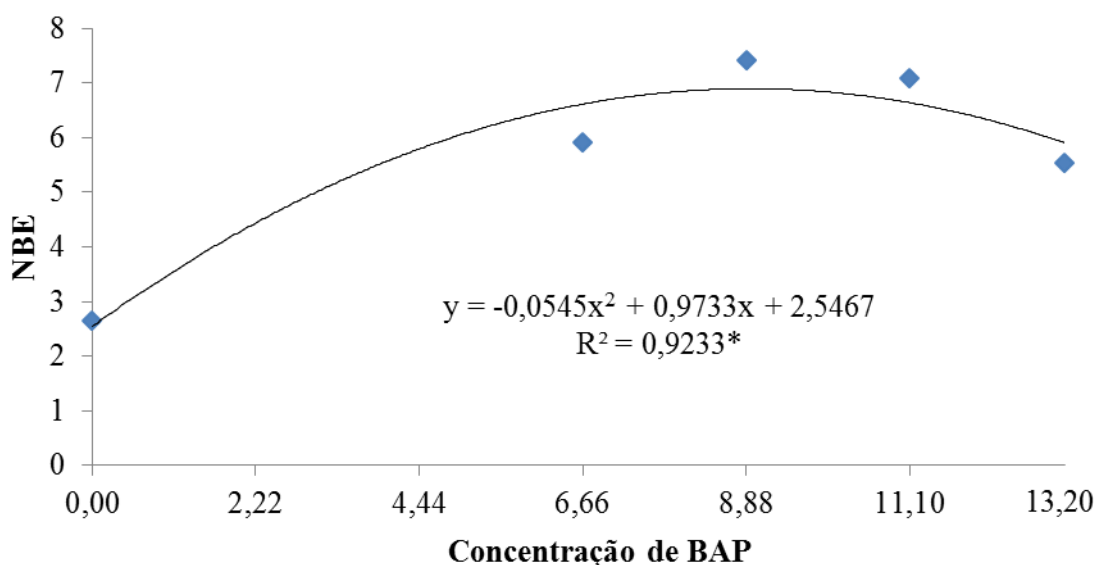


Figura 3. Número de brotos por explante (NBE) em função de diferentes concentrações de BAP em explantes caulinares de *Orthophytum mucugense* após 60 dias de cultivo *in vitro*. *Significativo a 5% de probabilidade.

Naturalmente os vegetais possuem compostos orgânicos, denominados hormônios vegetais, que em baixas concentrações podem induzir, modificar ou inibir seus processos fisiológicos, e há reguladores vegetais sintéticos que apresentam ações semelhantes aos hormônios e podem ocasionar tanto a promoção quanto a inibição de processos metabólicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta (ALBUQUERQUE; MOUCO; ALBUQUERQUE NETO, 2008). Como exemplo do BAP que se torna tóxico para o explante quando em níveis elevados (COLETTI; MARTINS; GOULART, 2008), o que pode ser constatado na análise da Figura 3 deste estudo, em que possivelmente as concentrações mais altas dessa citocinina levaram à toxidez interferindo na formação de brotos de *O. mucugense*.

Estes resultados diferem do encontrado por Garcia (2013) que na multiplicação de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana* a partir de explantes caulinares obteve as maiores médias para número de brotos por explantes de *A. miniata* (14,48) e *A. blancheteana* (9,39 e 10,49) na maior concentração de BAP utilizada (13,32 µM). Ainda de acordo com os dados deste autor os tratamentos testados utilizando BAP apresentaram médias superiores a do controle, comportamento similar ao do presente estudo.

Já Santa-Rosa et al. (2013) avaliando o número médio de brotos produzidos a partir de explantes caulinares de *Aechmea distichantha*, utilizando BAP, conseguiram maior média na menor concentração testada 2,2 µM, o que diverge dos resultados apresentados para a espécie em estudo no qual o ponto máximo é atingido na concentração de 8,92 µM após 60 dias.

O modelo quadrático para o efeito de BAP sobre o NBE gerado neste trabalho com valor máximo estimado na concentração de 8,92 μM se assemelha ao resultado obtido por Rocha (2010) na multiplicação de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, na qual testou o efeito de diferentes concentrações de BAP associada a 2,68 μM de ANA em segmentos do talo de plantas *in vitro* e também obteve modelo quadrático de regressão para efeito desta citocinina no número de brotos formados, com maior média na concentração de 8,88 μM .

O tipo e concentração de citocininas utilizadas são os principais fatores de influência no êxito da multiplicação *in vitro* (VILLA et al., 2006), sendo a BAP a mais utilizada nesse processo, demonstrando os melhores resultados para várias espécies (SANTOS et al., 2006). Ademais, a fim de aumentar as taxas proliferativas alguns autores têm comparado a utilização de reguladores em meio semisólido e líquido, visto que este pode propiciar aos explantes uma maior absorção dos compostos do meio de cultura.

Neste sentido, os resultados mostrados para este estudo utilizando meio semisólido indicaram que as concentrações de BAP utilizadas foram significativas na formação de brotos, o que difere do apresentado por Pasqual et al. (2008) trabalhando com *Ananas comosus* var. *erectifolius* e Oliveira et al. (2007) com *Ananas lucidus* que testaram meio líquido e na presença de ágar, e neste último não observaram efeito significativo do BAP. No entanto, obtiveram no meio líquido um aumento linear no número de brotos por explante atingindo o número máximo de 21 brotações na maior concentração de BAP utilizada (6,66 μM) após 45 dias para *A. comosus*, e maior média de 15,80 na concentração de 8,88 μM após 7 semanas para *A. lucidus*.

Assim como demonstrado neste trabalho o BAP também apresentou efeito significativo em gemas de plantas de abacaxi ‘Gomo de mel’ estabelecidas *in vitro* em estudo realizado por Costa (2009), porém o autor utilizou meio líquido e após 90 dias alcançou número máximo de brotos 7,03 na concentração de 6,66 μM , já para *O. mucugense* foi utilizado meio semisólido e a concentração de 8,92 μM indicou o ponto máximo.

Estas variadas respostas aos reguladores vegetais em diferentes espécies podem estar também relacionadas ao balanço das concentrações endógenas dos hormônios que se acumulam no explante, e da interação entre estes e às concentrações exógenas dos reguladores utilizados.

Nos estudos realizados por Bellintani et al. (2008) e Lima et al. (2012), o número de brotos por explante apresentaram maiores valores nas concentrações combinadas de BAP (2,22 μM) e ANA (0,65 μM) para *O. mucugense*. Já os resultados apresentados neste estudo revelam que tanto para BAP quanto para ANA e independente das concentrações utilizadas as médias

obtidas foram superiores à maior média (1,37) encontrada por Lima et al. (2012) para a mesma espécie após 60 dias de cultivo, na combinação desses reguladores, e utilizando explantes caulinares com 60 dias.

Bellintani et al. (2008) trabalhando com *O. mucugense* encontrou valores de 7 a 12 brotos por explante, sendo que no presente estudo o maior valor obtido foi de 7,43 para efeito isolado de ANA na concentração de 5,20 μM , porém, no trabalho realizado por esta autora os explantes caulinares foram utilizados com 6 meses de idade, com melhor resposta na combinação de BAP e ANA, e a avaliação do experimento foi realizada após 6 meses de cultivo, já no presente estudo os explantes foram utilizados com 5 meses de idade, houve efeito isolado dos reguladores, e a avaliação foi realizada com apenas 60 dias. Portanto, nota-se que a produção de brotos ocorreu em menor tempo e com redução de custos.

De modo geral, as raízes obtidas em ambos os tratamentos de enraizamento *in vitro* foram finas, longas e ramificadas (Figura 4). A análise de variância apontou resposta não significativa para a variável porcentagem de explantes enraizados (%EE) ($p \geq 0,05$) (Tabela 2 do apêndice A), tendo obtido 92,5% e 100% de enraizamento nos tratamentos com 30 e 60 dias, respectivamente.



Figura 4. (A) Microplantas oriundas do tratamento de enraizamento por 30 dias; (B) Microplantas oriundas do tratamento de enraizamento por 60 dias. Escala de 1 cm. Fonte: Autora (2016).

Para as variáveis número de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (CMR) a resposta aos tratamentos foi altamente significativa ($p \leq 0,01$) (Tabela 2 do apêndice A). Observa-se na tabela 2 que tanto a variável NR quanto CMR apresentaram o mesmo comportamento, com diferença estatística significativa do tratamento com 60 dias em relação ao de 30 dias.

Tabela 2. Variáveis número de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (CMR) em função dos tratamentos de 30 e 60 dias de enraizamento de *Orthophytum mucugense*.

| Variáveis | Tratamentos | |
|-----------|-------------|---------|
| | 30 dias | 60 dias |
| NR | 2,95 b | 3,95 a |
| CMR (cm) | 5,67 b | 10,06 a |

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O enraizamento *in vitro* de *O. mucugense* já havia sido demonstrado por Bellintani et al. (2007) acrescentando ao meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ 1 g.L⁻¹ de carvão ativado combinado com

diferentes concentrações de sacarose, porém os autores não apresentaram análise do sistema radicular. Já Lima et al. (2012) utilizaram diferentes concentrações de ácido-indol-3-butírico (AIB) combinadas ou não com 1 g.L⁻¹ de carvão ativado adicionados ao meio MS ½ para o enraizamento da mesma espécie, e obtiveram como melhor resultado a média de 4,90 cm para comprimento das raízes na presença apenas do carvão, sendo esta média menor do que a gerada no presente estudo tanto no tratamento de 30 dias (5,67 cm) quanto no de 60 dias (10,06 cm).

Em ambos os trabalhos com *O. mucugense* (BELLINTANI et al., 2007; LIMA et al., 2012) os autores recomendaram o acréscimo de carvão ativado ao meio de cultura por um período de 60 dias. Esse efeito positivo do carvão sobre o enraizamento *in vitro* pode ser constatado também neste estudo, no qual mesmo por um período de 30 dias houve alta taxa de explantes enraizados, o que pode reduzir o tempo de manutenção das culturas *in vitro*, além de reduzir os custos já que não há necessidade do uso de regulador de crescimento.

Ao contrário do demonstrado neste estudo muitos autores apontam a necessidade do uso de auxina no enraizamento *in vitro* de espécies de Bromeliaceae, como Mendes et al. (2007b) em trabalho com *Vriesea cacuminis* e Naves et al. (2005) com *Alcantarea imperialis* que utilizaram a auxina ANA e obtiveram respectivamente médias de 0,9 para número de raízes e 3,9 cm para comprimento das raízes, inferiores as alcançadas no presente estudo sem o uso de reguladores. Martins et al. (2013) também utilizaram o ANA no enraizamento de *Neoregelia concêntrica* e apresentaram para número de raízes no tempo de 30 dias a média 7,12 e 9,93 com 60 dias, médias maiores do que a deste estudo; e para o comprimento da maior raiz média de 2,177 cm após 60 dias, inferior a deste trabalho.

Silveira et al. (2009b) testaram o ANA combinado com citocininas para o enraizamento *in vitro* de *Neoglaziovia variegata* e concluíram que a presença da auxina aumentou a taxa de enraizamento.

Além do ANA outra auxina utilizada no enraizamento de bromélias é o AIB, como demonstrado por Oliveira et al. (2010) que enraizaram brotos de *Ananas bracteatus* utilizando essa auxina, e após 30 dias obtiveram média de 7,2 para número de raízes, maior do que a registrada neste estudo, e para comprimento das raízes média de 1,4 cm menor do que a obtida para *O. mucugense*. O AIB também foi utilizado por Silva et al. (2008) para o enraizamento de *Dyckia marítima* e alcançaram média de 1,4 para número de raízes após 60 dias; inferior as médias apresentadas neste trabalho para esta variável.

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a rizogênese ocorre em três fases: indução, iniciação e alongamento, sendo que as duas primeiras dependem de auxina e a última é inibida pela presença desta. Possivelmente no presente estudo a concentração de auxina

endógena foi suficiente para iniciar e induzir a formação de raízes em combinação com o carvão ativado, que permitiu também o alongamento das raízes geradas.

O carvão tem sido utilizado para a formação de raízes adventícias e fisicamente cria uma condição de escuro onde as raízes geralmente têm um melhor desenvolvimento; além disso, quimicamente esta substância age modificando a composição do meio de cultura já que adsorve componentes residuais, como citocininas que podem estar presentes nos tecidos das plantas, e componentes tóxicos do meio de cultura, como fenóis e quinonas, que podem inibir o enraizamento (ASSIS; TEXEIRA; 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SOUZA; PEREIRA, 2007).

Esta etapa de enraizamento *in vitro* é importante para o sucesso da micropropagação, pois pode influenciar a sobrevivência das microplantas após a transferência para o ambiente *ex vitro*. Portanto, após avaliação do enraizamento todas as microplantas foram transferidas para casa de vegetação para avaliar a sobrevivência das mesmas.

A análise de variância para porcentagem de sobrevivência (%S) das plantas aclimatizadas indicou que não houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) da interação tempo de enraizamento x tipo de exposição na aclimatização, e o efeito isolado do tempo de enraizamento também não foi significativo ($p \leq 0,05$) (Tabela 3 do apêndice A), sendo que após 120 dias os tratamentos com período de enraizamento de 30 dias apresentaram 95% de sobrevivência, e os tratamentos com período de 60 dias mostraram 97,5%.

Isto demonstra que apesar dos resultados na etapa de enraizamento terem sido superiores no tratamento de 60 dias, não houve diferença entre os dois períodos testados quanto a sobrevivência das plantas na aclimatização; desse modo o período de 30 dias é indicado para o enraizamento o que é vantajoso, pois reduz o tempo de manutenção das culturas *in vitro*, diminui o tempo para obtenção de mudas, e gera economia no processo de micropropagação.

Em relação ao tempo de enraizamento os resultados obtidos neste estudo contrapõem os obtidos em outros trabalhos com bromélias, nos quais foram requeridos um maior tempo para o enraizamento de brotos *in vitro*. Garcia (2013) utilizou 60 dias para o enraizamento *in vitro* de *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana*. Naves et al. (2005) trabalhando com *Alcantarea imperialis* e Silva et al. (2008) com *Dyckia marítima* também enraizaram os brotos por um período de 60 dias. Já Mendes et al. (2007b) mantiveram as culturas *in vitro* por um período de 90 dias para o enraizamento de *Vriesea cacuminis*.

Além do tempo de enraizamento algumas espécies precisam passar por um período de rustificação *in vitro*. Isto porque as plantas produzidas *in vitro* são cultivadas em meio contendo sacarose e nutrientes que permitem um crescimento heterotrófico, sob baixa intensidade

luminosa, e alta umidade, fatores que levam a condições fisiológicas e anatômicas que podem acarretar na morte da planta ao ser transferida para o ambiente *ex vitro*; portanto, a adaptação as novas condições ambientais pode ser feita de modo gradual (HAZARIKA, 2003) através da rustificação *in vitro* e de estratégias para reduzir a perda de água após a transferência.

Alguns autores tem utilizado a rustificação *in vitro* em espécies de bromélias como Silveira et al. (2013) em estudo com *Neoglaziovia variegata*, que realizaram a pré-aclimatização utilizando tampão de algodão junto com o enraizamento *in vitro* por 30 dias. Silva et al. (2008) trabalhando com *Dyckia marítima* também efetuaram a pré-aclimatização em sala de crescimento mantendo as microplantas em caixas plásticas, durante 60 dias.

Em estudo realizado por Bellintani et al. (2008) com *O. mucugense* os autores concluíram que após 30 dias de enraizamento *in vitro* as microplantas devem passar por um processo de pré-aclimatização por mais 30 dias mantendo os tubos fechados com algodão. Lima (2008) trabalhando com a mesma espécie concluiu que o processo de rustificação utilizando tampão de algodão pode ser realizado durante o enraizamento *in vitro* por 60 dias. Já no presente estudo as microplantas não passaram por um período de rustificação, no entanto apresentaram altas taxas de sobrevivência *ex vitro*.

Em relação ao tipo de exposição na aclimatização, cobertas ou diretamente expostas, a análise de variância também apontou efeito isolado não significativo ($p \leq 0,05$) para %S (Tabela 3 do apêndice A), com taxas de 97,5% e 95% para plantas cobertas e diretamente expostas, respectivamente (Figura 5), o que indica que as microplantas não necessitam de estratégias de controle da perda de água na aclimatização.

Estes resultados divergem dos registrados para outras bromélias, como se observa no trabalho realizado por Silveira et al. (2013) no qual após a rustificação aclimatizaram microplantas de *Neoglaziovia variegata* em estufa com nebulização, obtendo uma taxa de 100% de sobrevivência após 180 dias de aclimatização.

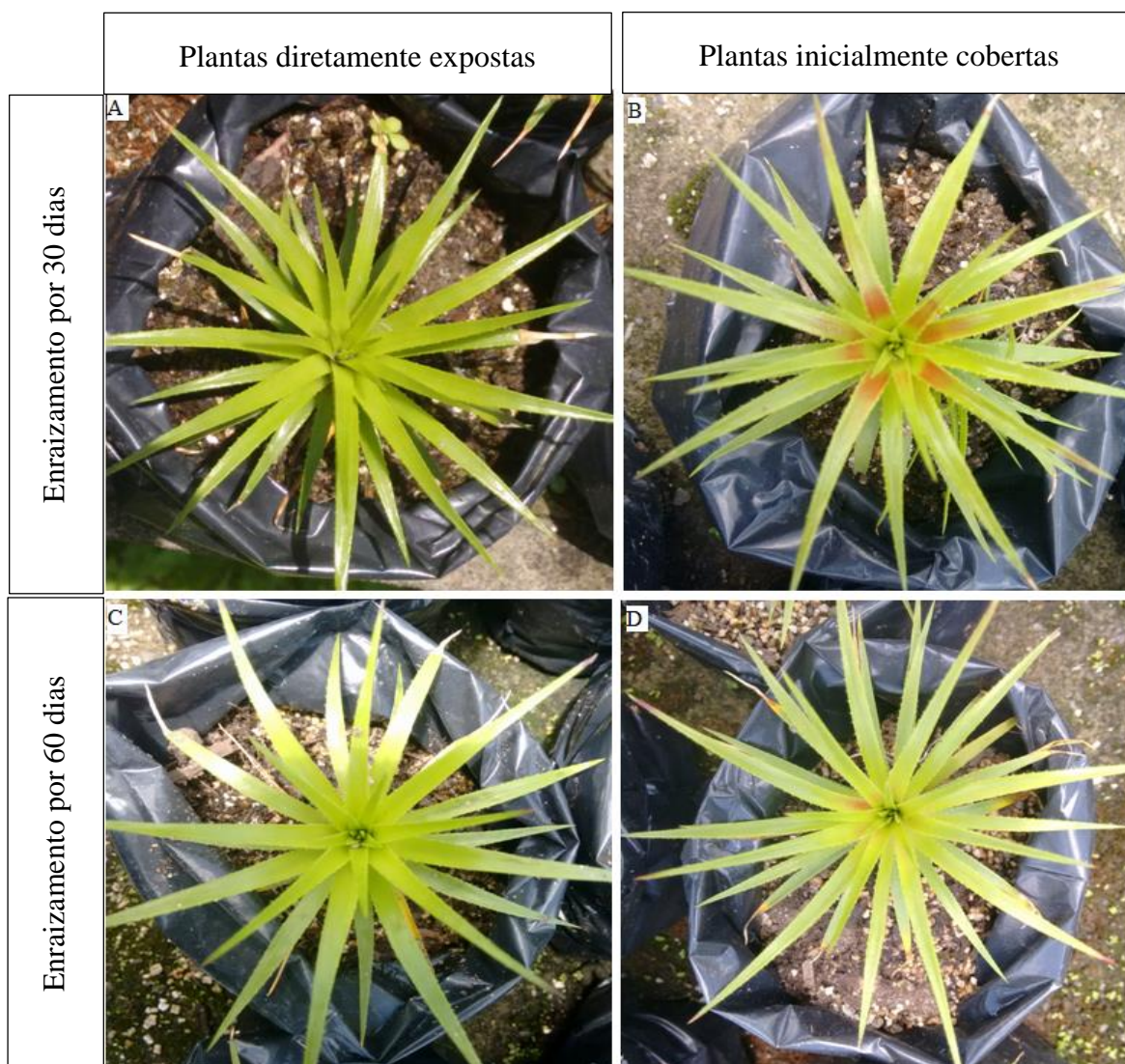


Figura 5. Plantas de *O. mucugense* após 120 dias de transplântio. (A) Plantas diretamente expostas e (B) Plantas inicialmente cobertas, oriundas do enraizamento por 30 dias. (C) Plantas diretamente expostas (D) Plantas inicialmente cobertas, enraizadas *in vitro* por 60 dias. Fonte: Autora (2016).

Silva et al. (2008) transferiram microplantas pré-aclimatizadas de *Dyckia marítima* em caixas plásticas, para telado com Sombrite e com 30 dias as plantas foram diretamente expostas ao ambiente, após mais 30 dias os autores obtiveram uma porcentagem de 90% de sobrevivência, taxa inferior a alcançada neste estudo. Já Garcia (2013) em estudo com *Aechmea miniata* e *Aechmea blancheteana* realizou a aclimatização das microplantas em bandejas de polipropileno cobertas com polietileno transparente por 20 dias, em seguida as plantas foram diretamente expostas ao ambiente, e após 60 dias da transferência para o ambiente *ex vitro* foi obtido 100% de sobrevivência para ambas as espécies.

Em trabalho realizado por Bellintani et al. (2008) durante a aclimatização as microplantas de *O. mucugense* transplantadas permaneceram cobertas por garrafa pet durante

40 dias, com isso alcançaram uma porcentagem de sobrevivência de 95,4% após 100 dias de transplante. Trabalhando com a mesma espécie Lima (2008) durante a aclimatização cobriu as microplantas com garrafa pet por diferentes períodos 0, 5 e 10 dias, e 30 dias após a transferência para o ambiente *ex vitro* e não observou diferença na porcentagem de sobrevivência das plantas.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que não há necessidade de estratégias para redução da perda hídrica no início da aclimatização, corroborando Lima (2008); no entanto, diferindo desta autora, no presente trabalho as microplantas não passaram por um período de rustificação, indicando que estas podem ser transferidas do enraizamento *in vitro* por 30 dias em tubos fechados com PVC, para aclimatização com exposição direta ao ambiente *ex vitro* sem perda significativa dos indivíduos transplantados.

Organogênese indireta

Um pré-teste foi realizado utilizando explantes foliares apical, mediano e basal, e apenas o foliar basal apresentou competência celular, no entanto foi observada oxidação em todos os explantes, e por isso nos experimentos descritos a seguir as culturas foram mantidas no escuro.

A interação BAP x ANA não foi significativa ($p \geq 0,05$) para porcentagem de explantes com calo (%EC), assim como o BAP; a análise de variância indicou efeito significativo apenas do ANA ($p \leq 0,05$) para esta variável (Tabela 4 do apêndice A).

Em geral os calos obtidos apresentavam textura compacta, coloração bege com algumas áreas verdes, e presença de brotos regenerados a partir destes calos, o que caracteriza a organogênese indireta (Figura 6). Observa-se na tabela 3 que as médias obtidas na presença de ANA diferiram estatisticamente do controle na %EC, o que demonstra a relevância da auxina na formação desse aglomerado de células. O ANA é umas das auxinas mais utilizadas no cultivo *in vitro* sendo frequentemente aplicada na organogênese (COSTA; LOUREIRO; PEREIRA, 2008), e bastante empregada na indução e crescimento de calos (DUTRA et al., 2004).

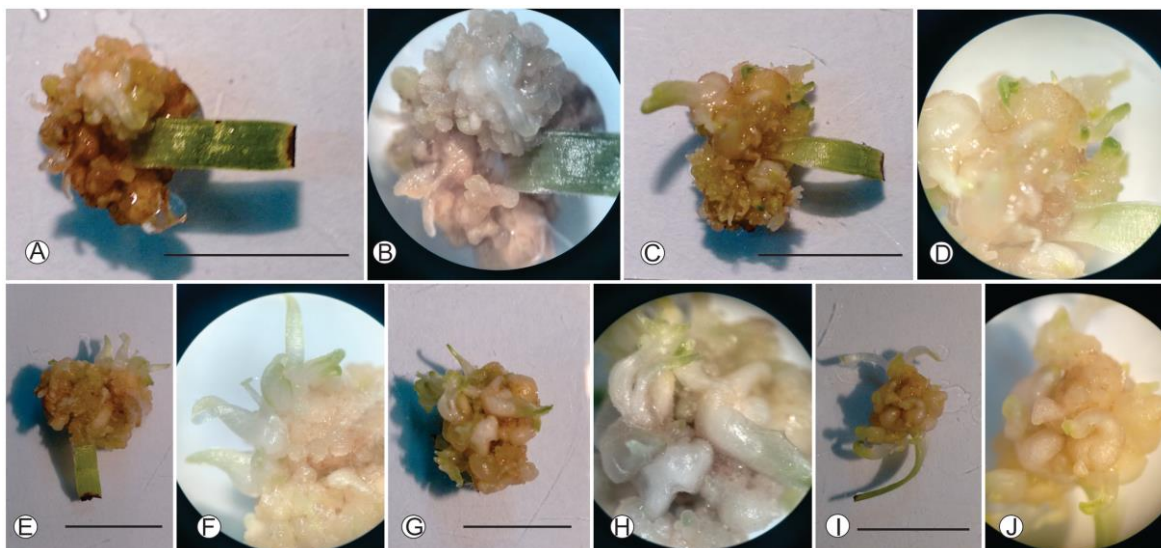


Figura 6. Respostas morfológicas de explantes foliares basal em diferentes concentrações de BAP e ANA. Figuras A, C, E, G, e I em escala de 1 cm; Figuras B, D, F, H e J ampliadas respectivamente das figuras A, C, E, G, e I. Fonte: Autora (2016).

Tabela 3. Porcentagem de explantes com calo (%EC) em função do ANA em explantes foliares basais de *Orthophytum mucugense*, após 60 dias.

| ANA (μM) | %EC |
|--------------------------|---------|
| 0,00 | 0,80 b |
| 2,60 | 46,40 a |
| 5,20 | 39,80 a |

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Estes resultados divergem do encontrado por Marcondes et al. (2014) trabalhando com gemas apicais de *Bromelia pinguin* L. e por Pineda, Vargas e García (2014) utilizando segmentos foliares basais de *Ananas comosus* (L.) Merr que alcançaram maior taxa para formação de calos na combinação de 2,685 μM de ANA e 22,2 μM de BAP, e 26,85 μM de ANA com 1,11 μM de BAP respectivamente, sendo que para *O. mucugense* a interação ANA x BAP não foi significativa.

Para porcentagem de explante com broto (%EB) e para o número de brotos por explante (NBE) a análise de variância apontou efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) da interação BAP x ANA (Tabela 4 do apêndice A).

Nota-se para %EB que na concentração de 2,60 μM de ANA combinada com as concentrações de BAP a partir de 8,88 μM , as médias obtidas não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram de 0,00 μM e 6,66 μM de BAP, cujas médias foram nulas; o mesmo comportamento foi observado para a variável NBE nestas condições (Tabela 4). Já na

concentração de 5,20 μM de ANA a média gerada na combinação com 8,88 μM de BAP foi significativamente superior as demais concentrações desta citocinina (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de explantes com broto (%EB) e número de brotos por explante (NBE) em função de BAP e ANA em explantes foliares basais de *Orthophytum mucugense*, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

| | | %EB | | |
|-----------------------|--|-----------------------|---------|-----------|
| | | ANA (μM) | | |
| BAP (μM) | | 0,00 | 2,60 | 5,20 |
| 0,00 | | 0 Aa | 0 Ba | 0 Ca |
| 6,66 | | 0 Aa | 0 Ba | 0 Ca |
| 8,88 | | 0 Ab | 28 Aa | 43 Aa |
| 11,10 | | 4 Ab | 28 Aa | 16 Bab |
| 13,32 | | 0 Ab | 36 Aa | 12 BCb |
| | | NB | | |
| | | ANA (μM) | | |
| BAP (μM) | | 0,00 | 2,60 | 5,20 |
| 0,00 | | 0 Aa | 0 Ba | 0 Ba |
| 6,66 | | 0 Aa | 0 Ba | 0 Ba |
| 8,88 | | 0 Ab | 0,72 Aa | 1,38 Aa |
| 11,10 | | 0,2 Ab | 1,2 Aa | 0,52 ABab |
| 13,32 | | 0Ab | 1,08 Aa | 0,4 Bab |

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

Analisando o NBE, a média obtida na concentração 5,20 μM de ANA associada a 8,88 μM de BAP diferiu estatisticamente das médias obtidas nas demais concentrações desta citocinina, exceto da 11,10 μM (Tabela 4).

Para ambas as variáveis na ausência de ANA, exceto na concentração de 11,10 μM de BAP, as médias obtidas foram nulas (Tabela 4). A presença de 2,60 μM de ANA promoveu diferenças significativas em relação às médias obtidas na ausência desta auxina quando combinada com as concentrações de BAP a partir de 8,88 μM , tanto para %EB quanto para NBE (Tabela 4). Já na concentração de 5,20 μM de ANA para %EB e NBE apenas a média gerada na combinação com 8,88 μM de BAP apresentou diferença estatística significativa entre a média proveniente desta concentração de citocinina e ausência de ANA (Tabela 4).

Isto indica que a presença da auxina promoveu um aumento nas respostas dos explantes à formação de brotos quando associada ao BAP. Desse modo, os resultados demonstram a importância do balanço entre auxina e citocinina nas respostas morfogênicas *in vitro*. Sendo o balanço em alto e baixo de citocinina/auxina favorável à formação de parte aérea (GUERRA; NODARI, 2006).

A regeneração de brotos de *O. mucugense* por organogênese indireta a partir de explante foliar basal alcançou taxa de 43 % para % EB demonstrada neste estudo contrapõem os resultados obtidos por Lima et al. (2008), que trabalhando com a mesma espécie apresentaram valores inferiores 9,44% e 14,44% para esta variável com brotos formados por organogênese direta na concentração de 2,22 μM de BAP associada a 0,65 ou 1,30 μM de ANA respectivamente, a partir de explantes foliares. Estes autores também apresentaram médias de 0,26 e 0,33 para NBE nas combinações de 2,22 μM de BAP com 0,65 e 1,30 μM de ANA respectivamente, que também são menores do que as obtidas neste trabalho. Isto confirma que a via indireta permite um aumento da formação de brotos em relação à via direta. Carvalho et al. (2014) afirmam que o processo de organogênese indireta possibilita a obtenção de maiores taxas de plantas regeneradas.

A formação de brotos por via indireta demonstrada neste trabalho também foi obtida por Pineda, Vargas e García (2014) que utilizando segmentos foliares basais de *Ananas comosus* (L.) Merr conseguiram na combinação de 26,85 μM de ANA com 1,11 μM de BAP brotos formados a partir de calos. No entanto, a média de 3,43 para NBE obtida após 3 meses de cultivo, é superior às médias do presente estudo no qual foram utilizadas concentrações menores de ANA e o tempo de cultivo foi de 2 meses.

Já Carneiro et al. (1999) avaliaram o efeito da combinação de diferentes concentrações de BAP e ANA em explantes foliares de *Neoregelia cruenta* e obtiveram os melhores resultados para porcentagem de explantes com brotos e número de brotos por explantes na associação de 22 μM de BAP com 2,5 μM de ANA por organogênese direta, o que se opõe aos resultados apresentados neste trabalho cujos brotos foram obtidos pela via indireta da organogênese.

Na indução de calos utilizando 2,4-D e BAP, os explantes foliares apicais e medianos não apresentaram resposta morfogênica. Somente os explantes folha basal e raiz foram responsivos à formação de calos (Figura 7 e Figura 8, respectivamente), portanto os resultados apresentados correspondem a estes dois explantes. Os calos apresentaram textura friável e coloração que variou do branco ao amarelo claro, e não foi observada a regeneração de brotos em nenhum dos tratamentos.

A análise de variância apresentou interação tripla altamente significativa ($p \leq 0,01$) entre BAP, 2,4-D e tipos de explante para a porcentagem de explantes com calo (%EC) (Tabela 5 do apêndice A).

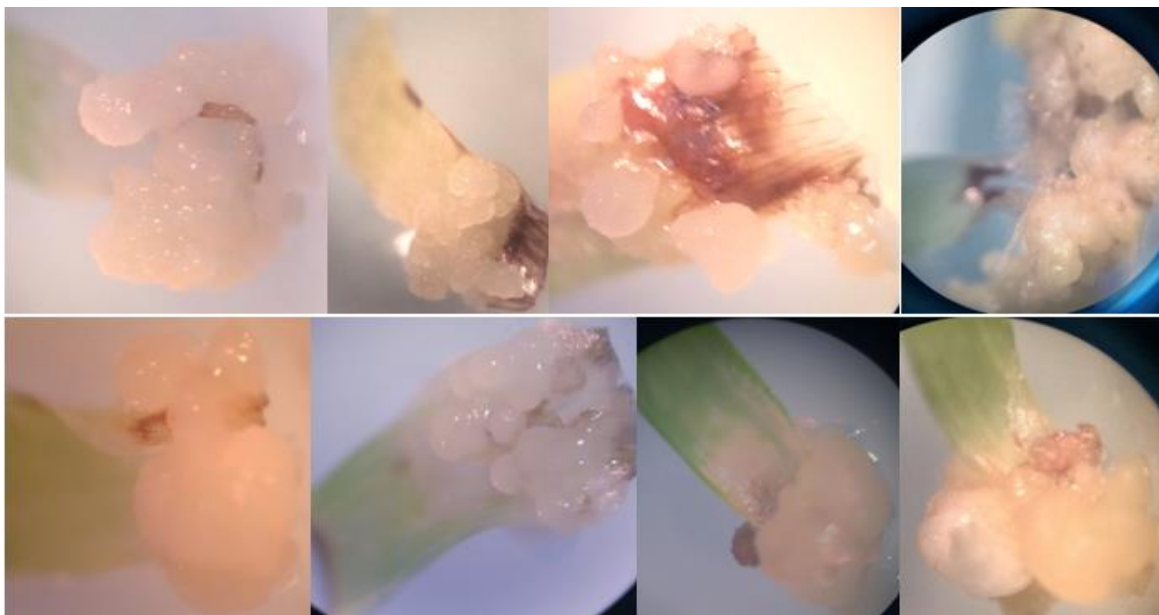


Figura 7. Respostas morfológicas de explantes foliares basal de *O. mucugense* em meio de cultura contendo 2,4-D e BAP após 60 dias de cultivo *in vitro*. Fonte: Autora (2016).

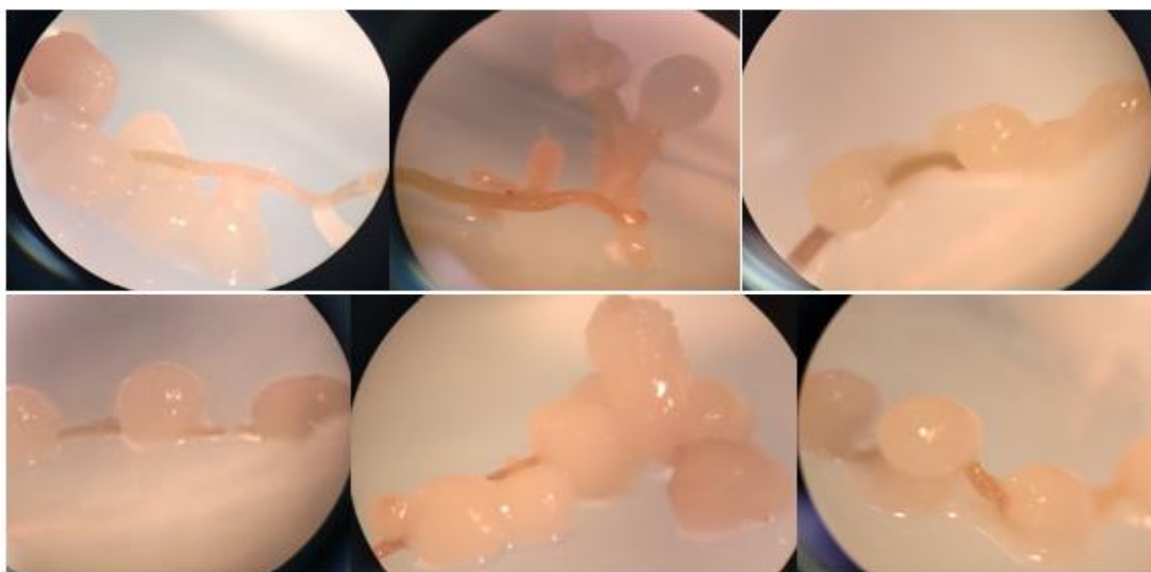


Figura 8. Respostas morfológicas de explantes radiculares de *O. mucugense* em meio de cultura contendo 2,4-D e BAP após 60 dias de cultivo *in vitro*. Fonte: Autora (2016).

Observou-se que a folha basal apresentou diferença estatística significativa em relação à raiz quando se utilizou a concentração de 5,0 μM de BAP e presença de 2,4-D (Tabela 3). Já para o explante raiz houve diferença estatística significativa em relação à folha basal na ausência desta citocinina e presença de 2,4-D (Tabela 5). Segundo Carvalho et al. (2011) a capacidade para formar calos varia com os tipos de explantes utilizados. No presente estudo ambos os explantes apresentaram altas taxas de formação de calos, o que ratifica a importância de testar diferentes tipos de explantes de uma mesma planta a fim de maximizar a taxa proliferativa.

Nota-se para o explante folha basal que na presença da auxina o aumento das concentrações de BAP promoveu um incremento na formação de calos, visto que na ausência desta citocinina as taxas obtidas foram baixas e ao adicioná-la ao meio de cultura houve aumento na %EC, que apresentaram diferenças significativas nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM de BAP em relação a ausência desta citocinina (Tabela 5). Estes resultados possivelmente indicam que o acréscimo de BAP ao meio promoveu um balanço auxina/citocinina favorável à indução de calo.

Tabela 5. Porcentagem de explantes com calo (%EC) em função das concentrações de BAP, 2,4-D e do tipo de explante em segmentos foliares e radiculares de *Orthophytum mucugense*.

| FOLHA BASAL | | | |
|---------------------|-------------------|-------|-------|
| 2,4-D μM | BAP μM | | |
| | 0,0 | 2,5 | 5,0 |
| 0,0 | 0Ba | 0Ba | 0Ba |
| 5,0 | 32Ab | 88Aa | 84Aa* |
| 10,0 | 34Ab | 84Aa* | 84Aa* |
| 15,0 | 28ABb | 72Aa | 92Aa* |
| 20,0 | 8ABb | 76Aa | 84Aa* |
| RAIZ | | | |
| 2,4-D μM | BAP μM | | |
| | 0,00 | 2,5 | 5,0 |
| 0,0 | 12Ba | 16Ba | 12Ba |
| 5,0 | 92Aa* | 68Aa | 32ABb |
| 10,0 | 92Aa* | 56Ab | 33ABb |
| 15,0 | 80Aa* | 70Aab | 48Ab |
| 20,0 | 84Aa* | 68Aa | 60Aa |

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. *Indica diferença estatística significativa entre os explantes.

Já quanto ao explante radicular a presença de BAP gerou uma redução na formação de calos apontada pela diminuição das médias apresentadas nas concentrações de 2,5 μM e 5,0 μM de BAP ambas na presença de 2,4-D; sendo que também na presença dessa auxina, exceto na maior concentração, houve diferença estatística significativa entre as médias obtidas na ausência de BAP e na concentração de 5,0 μM do mesmo (Tabela 5).

Em relação ao efeito do 2,4-D no explante foliar, nota-se que independente da presença de BAP, na ausência desta auxina não ocorreu indução de calos, sendo que com a adição do 2,4-D houve formação de calo, que aumentou à medida que as concentrações foram elevadas até atingirem um ponto máximo a partir do qual a %EC tende a diminuir seguindo o modelo de regressão quadrática (Figura 9A). Observa-se que as maiores taxas foram obtidas na concentração de 5,0 μM de BAP em função das concentrações de 2,4-D, resultando a maior taxa na concentração de 15 μM dessa auxina (Figura 9A), o que corrobora Nogueira et al. (2007)

que afirmam que o balanço hormonal entre citocininas e auxinas e seus níveis endógenos e exógenos podem promover a proliferação celular.

Os pontos máximos de 10,37; 12,70 e 13,49 μM de 2,4-D calculados para 0,0; 2,5 e 5,0 μM de BAP respectivamente, geraram os respectivos valores máximos estimados de 36,44%, 92,81% e 100%, indicando que pode ser alcançada uma taxa de 100% de explantes responsivos à formação de calo.

Para o explante radicular, observa-se que o efeito do 2,4-D apresentou modelo quadrático de regressão nas concentrações de 0,0 μM e 2,5 μM de BAP, sendo que na concentração de 5,0 μM o modelo de regressão foi linear (Figura 9B). Este último gerou as menores taxas, mas indica que estas são ascendentes à medida que a concentração de 2,4-D aumenta; no entanto, as % EC mais elevadas foram geradas na ausência de BAP, sendo a maior delas obtida nas concentrações de 5 μM e 10 μM de 2,4-D, a partir da qual as taxas diminuem, e a curva entra em declínio a partir de 15 μM (Figura 9B).

Contudo, na ausência de BAP o ponto máximo foi atingido na concentração de 11,07 μM de 2,4-D no qual o valor máximo estimado para %EC é de 97,71%. Já na concentração de 2,5 μM de BAP o ponto máximo foi de 14,52 μM de 2,4-D com valor máximo estimado de 72,10%, mostrando que o percentual de explantes com calos pode ser aumentado.

Em ambas as figuras é notável o aumento das taxas quando o 2,4-D é acrescido ao meio de cultura demonstrando a relevância dessa auxina na indução de calos. Atestando a literatura que diz que uma característica importante do 2,4-D é o seu elevado efeito na indução da divisão celular e na formação de calos (HUANG et al., 2011) sendo a auxina mais utilizada para esta finalidade (NOGUEIRA et al., 2007). De acordo com George (1996) o 2,4-D induz a transcrição de RNA mensageiros que codificam proteínas importantes para o crescimento e que podem levar à proliferação celular desordenada.

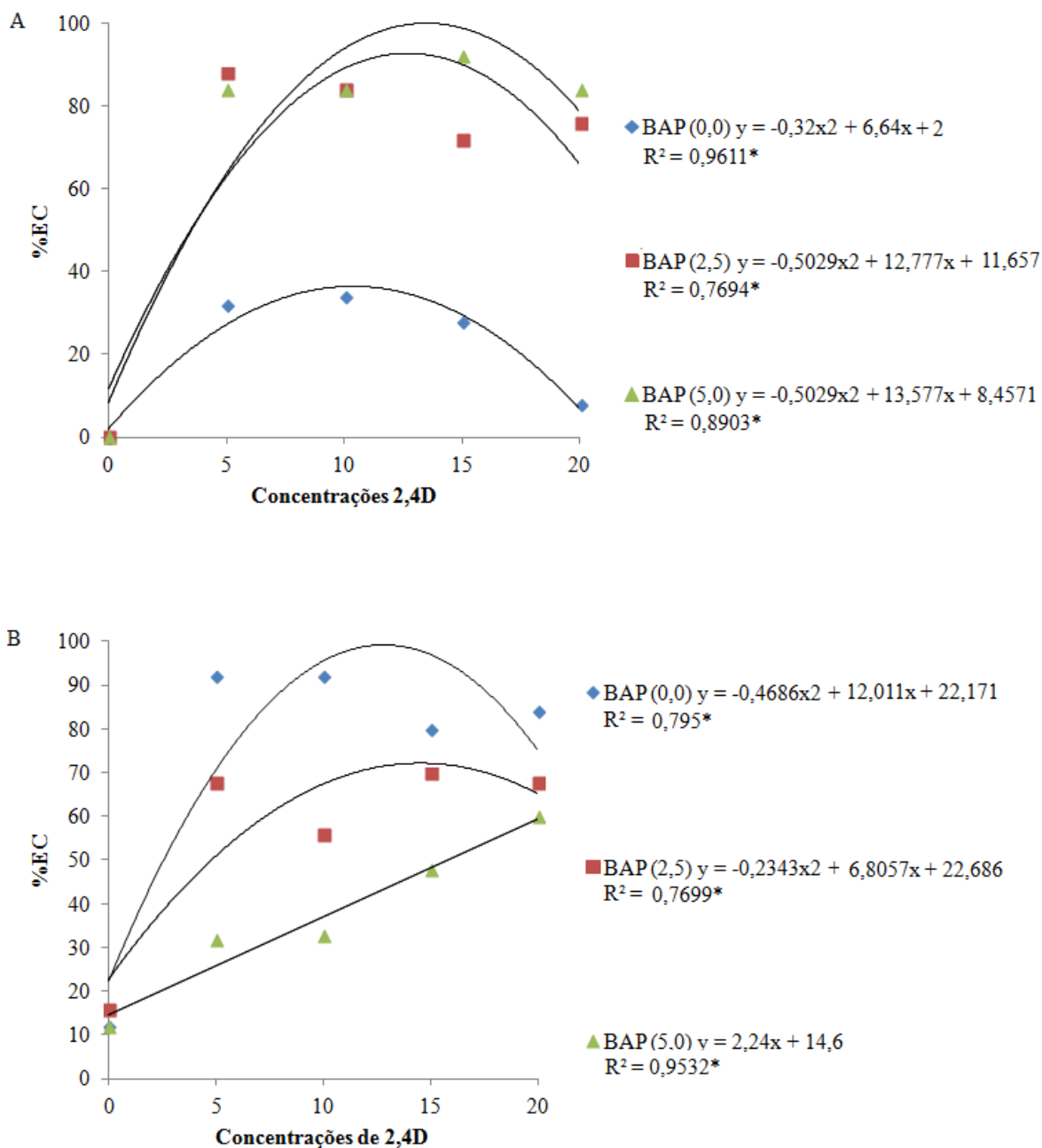


Figura 9. Porcentagem de explantes com calos (% EC) em explantes foliares basais (A) e em explantes radiculares (B) em função de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. *Significativo a 5% de probabilidade.

Alves, Vesco e Guerra (2006) testaram diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com 1 μM de CIN na indução de calos de *Vriesea reitzii* a partir de segmentos foliares e obtiveram a maior porcentagem de 90,6% na presença de 20 μM de 2,4-D e 1 μM de CIN após 6 semanas de cultivo, taxa similar a deste estudo no qual a melhor %EC para o explante foliar foi de 92% no entanto em uma concentração de 2,4-D menor do que a utilizada por estes autores.

As taxas obtidas neste estudo para os segmentos foliares basal na presença apenas da auxina estão próximas às apresentadas por Moreira (2011) em trabalho com *Ananas comosus*

var. erectifolius no qual submeteu explantes foliares basais a diferentes concentrações de 2,4-D e obteve como porcentagens significativas para formação de calos 31,43%, 40% e 35% para 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M respectivamente. No entanto, essas taxas são inferiores a maior porcentagem apresentada 92% na combinação de 15 μ M de 2,4-D com 5 μ M de BAP, o que confirma o observado por Melo, Melo e Appezzato-da-Glória (2000) que o acréscimo de citocinina ao meio melhorou o processo de divisão celular.

Estes resultados na ausência de BAP e presença 2,4-D para segmento foliar basal também se assemelham ao estudo realizado por Pineda, Vargas e García (2014) que trabalhando com *Ananas comosus* (L.) Merr obtiveram baixas taxas 10% de formação de calo em segmentos foliares basais utilizando apenas o 2,4-D, porém essa taxa é inferior à apresentada para *O. mucugense*.

Garcia (2013) em estudo com *Aechmea blancheteana* e Pompelli; Fernandes; Guerra (2005) trabalhando com *Dyckia distachya* Hassler obtiveram calos embriogênicos utilizando o 2,4-D. As auxinas são necessárias no processo de embriogênese, visto que desempenham função fundamental na indução de embriões na cultura e também no desenvolvimento morfológico adequado destes embriões, sendo o 2,4-D a mais utilizada nesse processo (ZIMMERMAN, 1993; REIS; LAMEIRA; CORDEIRO, 2007).

Em relação ao explante radicular, possivelmente a concentração endógena de citocinina foi suficiente para permitir um balanço favorável à formação de calo, já que segundo Taiz e Zeiger (2013) a raiz é um local de produção de citocininas, e estas possuem a capacidade de atuar localmente.

Nota-se que para este explante à medida que se aumentou a concentração de BAP as porcentagens de explantes com calos foram reduzindo em todas as concentrações de 2,4-D, como deve haver um balanço auxina/citocinina favorável para a formação de calos possivelmente o aumento da BAP no meio de cultura associada à citocinina endógena criou um balanço desfavorável a essa formação.

As raízes não são frequentemente utilizadas como explantes devido ao sua alta determinação à formação de novas raízes sendo difícil a obtenção de gemas caulinares, no entanto esse órgão vegetal é fonte de tecido meristemático que além de constituir o periciclo, é encontrado no ápice das raízes (PERES, 2002).

Lima et al. (2008) testaram explantes radiculares de *O. mucugense* em meio de cultura com BAP e ANA e não obtiveram resposta morfogênica, enquanto no presente estudo o uso de 2,4-D no explante radicular apresentou 92% de explantes com calos. Reafirmando a literatura

que diz que o 2,4-D é um dos reguladores mais indicados para indução de calos (NOGUEIRA et al., 2007; LIMA et al., 2008).

Todos os calos obtidos foram transferidos para meio de cultura isento de regulador e mantidos sob intensidade luminosa, nestas condições foi observado o aparecimento de áreas meristemáticas (Figura 10), após 60 dias estes calos foram transferidos para meio contendo 1 μ M de BAP, porém não houve formação de brotos.

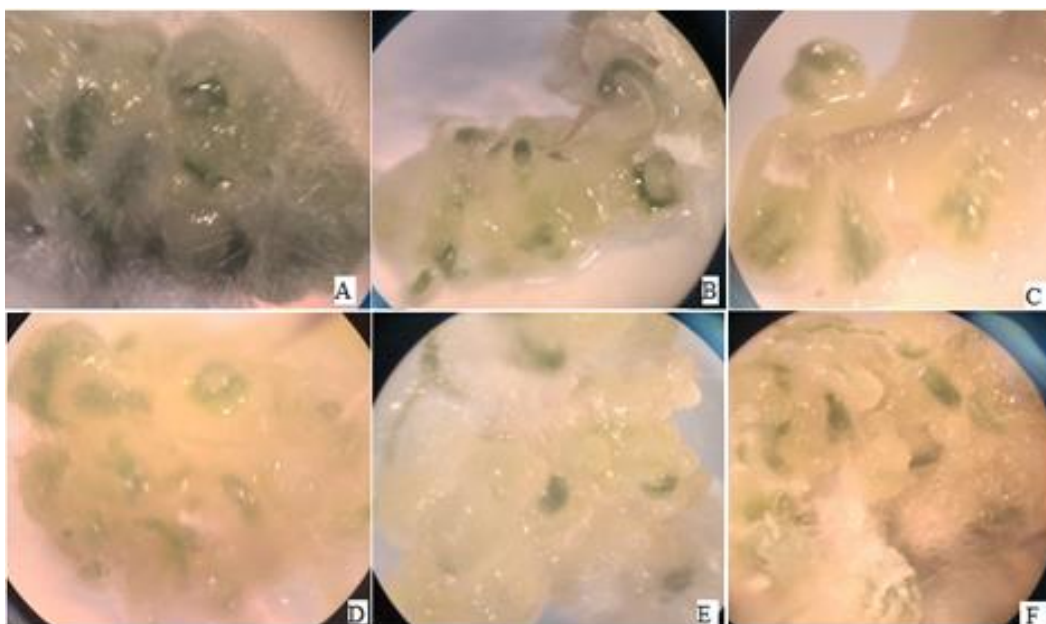


Figura 10. Áreas meristemáticas em calos oriundos de explantes radiculares (A-C) e foliares basal (D-F) submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. Fonte: Autora (2016).

CONCLUSÃO

A melhor taxa de multiplicação via organogênese direta a partir do explante caulinar foi obtida com a utilização 2,60 μM da auxina ANA.

Sugere-se que o enraizamento dos brotos seja realizado por 30 dias utilizando 1 g.L^{-1} de carvão ativado em tubos fechados com PVC.

As microplantas não necessitam de uma fase de rustificação antes da aclimatização.

A aclimatização das microplantas pode ser feita com exposição direta das mesmas ao ambiente *ex vitro* em casa de vegetação.

A organogênese indireta foi obtida com explante foliar basal submetido a uma combinação de 5,20 μM de ANA com 8,88 μM de BAP.

A combinação de 5 μM de 2,4-D com 2,5 μM de BAP é indicada para indução de calos em explante foliar basal; para o explante radicular é recomendado o uso isolado de 5 μM de 2,4-D. Sugere-se a realização de estudos que testem a capacidade regenerativa desses calos a fim de aumentar a taxa regenerativa via organogênese indireta ou embriogênica.

REFERÊNCIA

- ALBUQUERQUE, T. C. S. de; MOUCO, M. A. do C.; ALBUQUERQUE NETO, A. A. de. Reguladores de crescimento vegetal na concentração de macronutrientes em videira Itália. **Bragantia**, p. 553-561, 2008.
- ALVES, G. M.; VESCO, L. L. D.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 204–207, 2006.
- ARENHART, R. A.; ZAFFARI, G. R. Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 1, p. 16-22, 2008.
- ASSIS; T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI, v.1, p. 183-260. 1998.
- BATAGIN, K. D. et al. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiro cv IAC “Gomo-de-mel” micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 85-92, 2009.
- BELLINTANI, M. C. **Estudos da propagação *in vitro* e *ex vitro* de *Neoregelia mucugensis* Leme, *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição e *Orthophytum albopictum* Philcox, espécies de Bromeliaceae endêmicas da Bahia**. 2006. 115f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.
- BELLINTANI, M. C. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1101-1103, jul. 2007.
- BELLINTANI, M.C. et al. Resposta regenerativa *in vitro* de explantes caulinares de bromélias endêmicas da Chapada Diamantina– Bahia. **Magistra**, v.20, n.4, p.328-337, 2008.
- CARNEIRO L. A. et al. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 55:79-83, 1999.
- CARVALHO, D.C. de et al. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 108-114, jan./fev., 2011.
- CARVALHO, L. S. O. et al., Efeito do uso de gemas apicais e axilares na organogênese indireta de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. XXIII Congresso De Pós-Graduação da UFLA. **Anais**. 2014.
- CATUNDA, P. H. A. et al. Brassinosteróide e substratos na aclimatização do abacaxizeiro ‘Imperial’ -DOI: 10.4025/actasciagron. v30i3. 3512. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 345-352, 2008.

CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciênc. agrotec.**, v. 29, n. 6, 2005.

COLETTO, L. S.; MARTINS, C. R.; GOULART, M. Micropropagação de porta-enxerto de videira Paulsen 1103 *in vitro*, com diferentes concentrações de citocinina. **Revista da FZVA**, v. 15, n. 1, 2008.

COSTA, F. C. **Meio de cultura e luz na micropropagação do abacaxizeiro Gomo de Mel**. 2009. 67f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

COSTA, F. H. S. da; LOUREIRO, T. da S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 2, p. 269-274, 2008.

COSTA, G. M. da; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. de. *In vitro* propagation of *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.

COSTA, N. M. de S.; ALOUFA, M. A.I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 3, p. 195-198, 2006.

DUTRA, L. F. et al. Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 220-223, Feb. 2004.

ERIG, M. W.; SCHUCH, A. C.; Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FERREIRA, D.F. **SISVAR** Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, v.3, n.4. 2003.

FERREIRA, M. das G. R.; SANTOS, M. R. A. dos; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2009.

GARCIA, F. R. **Micropropagação e conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2013. 80f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana - BA, 2013.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2. Ed., Edington: Exegetics, 1996.

GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

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, v.1, p. 183-260. 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. Edição da Steinmacher, 2006.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HUANG, P. L. et al. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 105, n. 1, p. 73-78, 2011.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sementeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* hardening in different environment and acclimatization of microplants of *Comanthera mucugensis* Giul. Subsp. *Mucugensis*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, 2016.

LIMA, C. O. de C.; MARCHI, M. N. G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, BELLINTANI, C. E.; M. C.; SANTANA, J. R. F. de. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense* Direct organogenesis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.2, p.249-254, fev, 2012.

LIMA, C. O. de C. **Micropropagação e crescimento *in vitro* de brotos de *Orthophytum mucugense* WAND. E CONCEIÇÃO, bromeliaceae endêmica de Mucugê-Bahia.** 2008. f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.

LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.

LONDE, L.N. et al. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, 2007.

LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. das G. L. A new species of *Orthophytum* (Bromeliaceae) from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2011.

LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. das G. L. Revision of *Orthophytum* (Bromeliaceae): the species with sessile inflorescences. **Phytotaxa** 13, 2010.

LUTHER, H. E. Na alphabetical list of bromeliad binomials. **Bromeliad Society International**, ed. 11, 2008.

MARCONDES, M. A. et al. Calogênese *in vitro* de *Bromelia pinguin* L. sob efeito dos fitorreguladores ANA E BAP. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 736-743, 2014.

MARTINS, J. P. R. et al. Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 2, p. 138-146, 2013.

- MELLO, M. O.; MELO, M.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. *Bauhinia forficata* link shoot regeneration: histological analysis of organogenesis pathway. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 43, n. 4, 2000 .
- MENDES, G. C. et al. Enraizamento *in vitro* de *Vriesea cacuminis* LB Smith (Bomeliaceae) do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 969-971, 2007b.
- MENDES, G. C. et al. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 972-974, 2007a.
- MORAES, L. M. de; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. de Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl.(Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 24, p. 1397-1400, 2002.
- MORALES, C. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 5, n. 3, 1999.
- MOREIRA, C. M. **Biotechnology aplicada ao curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*): caracterização morfológica, micropropagação e embriogênese somática em segmento foliar**. 2011. 112f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NAVES, V. C. et al. Enraizamento e aclimatização de brotos regenerados *in vitro* de bromélia imperial. **Ornamental Horticulture**, v. 11, n. 1, 2005.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.
- OLIVEIRA, M. K. T. de et al. Propagação *in vitro* da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* miller). **Revista Caatinga**, v. 20, n. 3, 2007.
- OLIVEIRA, Y. de et al. Pré-aclimatização *in vitro* de abacaxi-ornamental. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, Edição Especial, p. 1647-1653, 2010.
- PASQUAL, Moacir et al. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 45-49, 2008.
- PEREIRA, J.E.S. et al. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.86-89, jan.-mar. 2005.
- PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 25, p. 44-48, 2002.

- PINEDA, A.; VARGAS, T. E.; GARCÍA, E. G. de. Regeneración de *Ananas comosus* (L.) merr, ecotipo tabë känä, mediante organogénesis indirecta. **Bioagro**, v. 26, n. 3, p. 135-142, 2014.
- PINHEIRO, M. V. M. et al. Micropropagação de antúrio 'IAC Eidibel' por meio da indução ao estiolamento e regeneração de plantas. **Ornamental Horticulture**, v. 15, n. 2, 2009.
- POMPELLI, M. F.; FERNANDES, D.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae)—an endangered bromeliad from South Brazil. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, n. 4, p. 192-198, 2005.
- REIS, I. N. R. de S.; LAMEIRA, O. Alves; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2, 4-D na Indução de Calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 498-500, 2007.
- ROCHA, M. A. C. da et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, 2008.
- ROCHA, M. A. C. **Multiplicação e conservação de Bromeliáceae Ornamentais**. 2010. 99f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2010.
- SANTA-ROSA, Sandra et al. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2013.
- SANTOS, B. R. et al. Micropropagation of "pequizeiro" (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.
- SILVA, A. L. L. da et al. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker—Bromeliaceae. **Iheringia Série Botânica**, v. 63, n. 1, 2008.
- SILVEIRA, D. G. et al. Aspectos morfofisiológicos na pre-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 544, 2013.
- SILVEIRA, D. G. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de Caroá. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.5, n.2, p. 118-128, 2009b.
- SILVEIRA, D. G. et al. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 923-932, 2009a.
- SOARES, F. P. et al. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 152-157, 2011.
- SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 103-116, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2013.

VERSIEUX, L. M. et al. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 98-110, 2008.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 266-270, 2006.

ZANELLA, C. M. **Caracterização genética, morfológica e fitoquímica de populações de Bromelia antiacantha (Bertol.) do Rio Grande do Sul**. 2009. 99f. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1411, 1993.

CAPÍTULO II

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Orthophytum mucugense* WAND. E CONCEIÇÃO

RESUMO

Orthophytum mucugense é uma espécie de bromélia endêmica de Mucugê que apresenta potencial ornamental e é alvo de extrativismo, sendo considerada como vulnerável; desse modo é necessária a realização de estudos de conservação *ex situ* desta espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da redução de sais, de agentes osmóticos e de retardante de crescimento na conservação *in vitro* de *O. mucugense* por crescimento mínimo. Foram utilizados como explantes plântulas germinadas *in vitro* com aproximadamente 2 cm de comprimento e após 300 dias de cultivo foram feitas avaliações de crescimento, teor de clorofila e capacidade regenerativa destas plantas. Para redução de sais, o meio MS com $\frac{1}{3}$ das concentrações salinas mostrou maior número de folhas verdes, manutenção da capacidade regenerativa, e não apresentou diferença entre os demais tratamentos para o teor de clorofila, sendo indicado para conservação da espécie. Analisando o efeito da sacarose e do manitol, a associação destas substâncias em 45 e 7,8 g.L⁻¹, respectivamente, é sugerida para conservação *in vitro* de *O. mucugense*. Já o uso do ancymidol não foi eficiente para induzir um menor crescimento das plantas, e não apresentou diferenças significativas para o teor de clorofila, contudo as plantas conservadas na presença deste regulador apresentaram melhores respostas na capacidade regenerativa em relação ao controle.

Palavras-chave: Bromélia. Crescimento mínimo. Teor de clorofila. Capacidade regenerativa.

ABSTRACT

Orthophytum mucugense is an endemic bromeliad from the municipality Mucugê which presents ornamental potencial and it is a target of extractivism, being considered as vulnerable; therefore, studies of *ex situ* conservation of this species are needed. The objective of this study was to evaluate the effect of reduction of salts, osmotic agents and growth retardant in *in vitro* conservation of *O. mucugense*. *In vitro* germinated seedlings approximately 2 cm in length were used as explants and after 300 days of cultivation, analyses of growth, chlorophyll content and regenerative capacity of these plants were made. For salt reduction, MS medium with $\frac{1}{3}$ of salt concentrations presented a higher number of green leaves, maintenance of regenerative capacity, and did not show any difference among the other treatments for chlorophyll content, being suitable for conservation of the species. Analyzing the effect of sucrose and mannitol, the combination of these substances at 45 and 7.8 g.L⁻¹, respectively, is suggested for *in vitro* conservation of *O. mucugense*. The use of ancymidol was not enough to induce a smaller plant growth, and did not show any significant differences in chlorophyll content, nevertheless, the plants preserved in the presence of this regulator presented better responses in the regenerative capacity compared to control.

Key-words: Bromeliad. Minimal growth. Chlorophyll content. Regenerative capacity.

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é composta por 58 gêneros dentre os quais se distribuem 3172 espécies (LUTHER, 2008), apresenta-se como um importante componente florístico em diversas formações vegetais, e se destaca pela relevância de suas espécies ornamentais, que são bastante cultivadas; sendo que as espécies brasileiras ocorrem em grande concentração na Cadeia do Espinhaço (VERSIEUX et al., 2008).

Localizada no leste do Brasil, a Cadeia do Espinhaço é uma formação montanhosa que abrange os estados de Minas Gerais e Bahia (SILVA et al., 2008) e é considerada a área mais importante de endemismo de Bromeliaceae, abrigando 62% de todos os taxa endêmicos (VERSIEUX; WENDT, 2007).

Entre os gêneros de bromélias encontrados na Cadeia do Espinhaço está o *Orthophytum* (VERSIEUX et al., 2008) formado por representantes terrestres, rupícolas ou saxícolas (FERREIRA; BELLINTANI; SILVA, 2007), e composto por 60 espécies restritas ao Brasil que se encontram nos estados do Espírito Santo, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Sergipe, Pernambuco, Alagoas, e Bahia (LOUZADA; WANDERLEY, 2011). Este último abriga a espécie em estudo, *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição.

Esta espécie é endêmica da Chapada Diamantina, Bahia e foi registrada no Parque Municipal Sempre Viva (WANDERLEY; CONCEIÇÃO, 2006), mas apesar de ocorrer em uma área de conservação é considerada como espécie vulnerável devido à sua ocorrência ser restrita ao município de Mucugê e ser alvo de extrativismo (WANDERLEY; CONCEIÇÃO, 2006; LIMA et al., 2012), o que torna importante a realização de estudos de conservação *ex situ* deste recurso genético vegetal.

Desse modo a cultura de tecidos vegetais pode ser uma opção viável para a conservação *ex situ* de *O. mucugense* através da técnica de conservação *in vitro*. Esta técnica tem sido utilizada e aprimorada para a manutenção de bancos ativos de germoplasma (BAG) *in vitro* (PEIXOTO; FARIA; MORAES, 2011), pois permite que uma grande quantidade de plantas sejam mantidas em um espaço físico reduzido e sem os riscos existentes no campo, com redução dos custos e mantendo a fidelidade genética, garantindo assim a disponibilidade de material para o intercâmbio de germoplasma, e estudos de melhoramento genético (FARIA et al., 2006). Para a garantia da diversidade genética do BAG uma opção viável é a utilização de coleções de plantas oriundas da germinação *in vitro*.

A conservação *in vitro* pode ser realizada por dois métodos: o crescimento mínimo e a criopreservação; neste último, temperaturas ultra-baixas são usadas para cessar o crescimento

da planta (FLORES et al., 2013). Já no crescimento mínimo ocorre uma redução no metabolismo da planta e conseqüente aumento nos intervalos de subcultivo; para isto podem ser realizadas modificações na composição do meio de cultura (LEMOS et al., 2002; SÁ; LÉDO; LÉDO, 2011) aumentando ou reduzindo as concentrações dos nutrientes, adicionando agentes osmóticos, ou retardantes de crescimento; e/ou modificações nas condições físicas do ambiente de cultivo, como redução da temperatura e luminosidade (DODDS; ROBERTS, 1985).

A redução nas concentrações salinas do meio de cultura irá disponibilizar uma menor quantidade de nutrientes para a planta em conservação o que poderá influenciar a sua fisiologia levando à redução do crescimento da mesma. Ademais, a utilização de meio de cultura mais diluído sem causar danos ao desenvolvimento das plantas gera uma economia de custos desejável para uma estratégia de conservação de germoplasma (TAMAKI; MERCIER; NIEVOLA, 2007).

Já os carboidratos como sacarose e manitol quando adicionados ao meio de cultura além de serem fontes de energia atuam como agentes osmóticos, influenciando as respostas fisiológicas das plantas devido ao estresse osmótico (SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011; FLORES et al., 2013) causado pela redução do potencial hídrico do meio, que acarreta uma diminuição da absorção de água e nutrientes pela planta, o que conseqüentemente reduz seu mecanismo de crescimento (FORTES; PEREIRA, 2001).

A adição de retardante de crescimento inibe a biossíntese de giberelina, isto reduz o comprimento da parte aérea da planta sem causar alterações nos padrões de desenvolvimento e sem efeito fitotóxico (THAKUR et al., 2006). Os inibidores de giberelina têm sido utilizados quando se deseja reduzir a altura da planta cultivada, como por exemplo, o ancymidol que inibe a ação das enzimas mono oxigenases P-450, bloqueando as reações de oxidação na etapa da conversão do ent-caureno a ácido carenóico na rota biossintética da giberelina, (RADEMACHER, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Além da redução do crescimento das plantas com manutenção da sobrevivência e vigor das mesmas, é imprescindível que as plantas conservadas mantenham sua viabilidade para que possam ser utilizadas como fonte de explantes para a multiplicação *in vitro*. Desse modo é importante avaliar a capacidade regenerativa destas plantas, assim como o teor de clorofila das mesmas, visto que esta medida é um indicador da capacidade fotossintética, e pode também sinalizar aspectos relacionados à nutrição.

Há registro de trabalhos de conservação *in vitro* de espécies de Bromeliaceae como *Dyckia distachya* (POMPELLI; GUERRA, 2004), *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata*

(MOREIRA, 2008), *Aechmea bambusoides* (FIGUEREDO et al., 2008), *Aechmea distichantha*, e *Aechmea leptantha* (SANTA ROSA, 2010), *Aechmea blancheteana* (SANTA ROSA, 2010; GARCIA, 2013), porém não há relatos de estudos de conservação *in vitro* para *O. mucugense*.

Portanto, neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de sais, agentes osmóticos e ancymidol na conservação *in vitro* por crescimento mínimo de *O. mucugense*.

MATERIAL E MÉTODO

Material vegetal

O material vegetal foi obtido a partir de sementes de *Orthophytum mucugense* coletadas no Parque Municipal de Mucugê, em Mucugê – Chapada Diamantina - Bahia. O estabelecimento *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Bellintani (2006), e foi iniciado com o processo de desinfestação das sementes, no qual estas foram imersas em álcool 70% por um minuto e em seguida em hipoclorito de sódio 3% por 15 minutos; decorrido este tempo, as mesmas foram lavadas em água destilada autoclavada por quatro vezes. Após a desinfestação, procedeu-se a semeadura em frascos de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura.

Para todos os experimentos de conservação plântulas de *O. mucugense* germinadas *in vitro* com aproximadamente 2 cm de comprimento foram utilizadas como explante.

Experimento I: Efeito da redução de sais no crescimento mínimo de *O. mucugense*

As plântulas foram inseridas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 18 ml de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) com metade da concentração salina (MS ½) (controle), e com as concentrações reduzidas para um terço (MS 1/3) e um quarto (MS ¼), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar, totalizando três tratamentos.

Experimento II: Efeito dos agentes osmóticos sacarose e manitol no crescimento mínimo de *O. mucugense*

As plântulas foram inseridas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 18 ml de meio de cultura MS ½ gelificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, e diferentes concentrações de sacarose combinadas ou não com manitol, totalizando cinco tratamentos apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos testados na conservação *in vitro* de *O. mucugense* sobre efeito dos agentes osmóticos sacarose e manitol.

| Tratamentos | Sacarose (g.L ⁻¹) | Manitol (g.L ⁻¹) | Potencial osmótico Total |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Controle | 30 | 0 | -0,2170 |
| T1 | 45 | 0 | -0,3255 |
| T2 | 60 | 0 | -0,4340 |
| T3 | 30 | 7,8 | -0,3255 |
| T4 | 45 | 7,8 | -0,4340 |

Experimento III: Efeito do retardante de crescimento ancymidol (ANC) no crescimento mínimo de *O. mucugense*.

As plântulas foram inseridas em tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo 18 ml de meio de cultura MS ½ suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e gelificado com 7 g.L⁻¹ de ágar acrescido de diferentes concentrações de ancymidol - ANC (0,00; 0,85; 1,70; 2,55; 3,40 µM).

Para os três experimentos descritos o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com 40 tubos por tratamento. Cada tratamento foi composto de dez repetições e quatro amostras por repetição (um explante por tubo).

Em todos os experimentos o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização foi realizada em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Avaliação das plantas conservadas

Foram feitas avaliações mensais da sobrevivência das plantas, e após 300 dias de conservação foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência (%S), porcentagem de plantas com brotos (%PB) e número de brotos por planta (NBP), considerando todas as amostras de cada tratamento. Já para as análises de crescimento foram utilizadas 15 amostras de cada tratamento e foram avaliados: número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), matéria fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), o teor de clorofila e a capacidade regenerativa.

Teor de clorofila

A determinação do teor de clorofila foi realizada de acordo com a metodologia de Arnon (1949) com ajustes. Para tanto folhas verdes sadias foram destacadas das plantas conservadas *in vitro* e pesadas 0,5 g para cada amostra. Posteriormente estas folhas foram maceradas com 15 ml de acetona 80% e depois filtradas em papel filtro. A parte filtrada foi completada com acetona 80% para 25 ml e depois foi realizada a medida da absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm. As análises foram realizadas em triplicata para cada tratamento.

No cálculo de clorofila foram utilizadas as fórmulas:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 12,7A_{663} - 2,69A_{645}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663}$$

Capacidade regenerativa

Explantos caulinares com 0,5 cm e explantes foliares basais e radiculares com 1 cm de comprimento oriundos das plantas conservadas *in vitro* por 300 dias nos experimentos I, II e III foram inseridos em tubo de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar acrescido de 2,60 µM de ANA para os explantes caulinares, 5,0 µM de 2,4-D para explantes radiculares, e 5,0 µM de 2,4-D com 2,5 µM de BAP para explantes foliares, conforme os resultados obtidos no capítulo I.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, para os explantes caulinares o tratamento constou de 15 repetições com uma amostra, e para os explantes foliares e radiculares 8 repetições com três amostras cada.

Após 60 dias foram avaliadas a porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos (%ERB), o número de brotos por explante (NBE) e a porcentagem de explantes responsivos à formação de calo (%ERC).

Condições de cultivo

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

Análise Estatística

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância a porcentagem de sobrevivência das plantas conservadas após 300 dias não foi influenciada por nenhum dos tratamentos testados ($p \geq 0,05$) (Tabelas 1, 2 e 3 do apêndice B). Foram obtidas altas taxas de sobrevivência em cada um dos três experimentos, que variaram de 97,5% a 100%.

No experimento de redução de sais a análise de variância apontou efeito significativo ($p \leq 0,05$) dos tratamentos apenas para a variável número de folhas verdes (NFV), as demais variáveis avaliadas: número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), e da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) não foram significativas ($p \geq 0,05$) (Tabela 4 do APÊNDICE). Não houve formação de brotos em nenhum dos tratamentos testados durante o período de conservação (Figura 1).

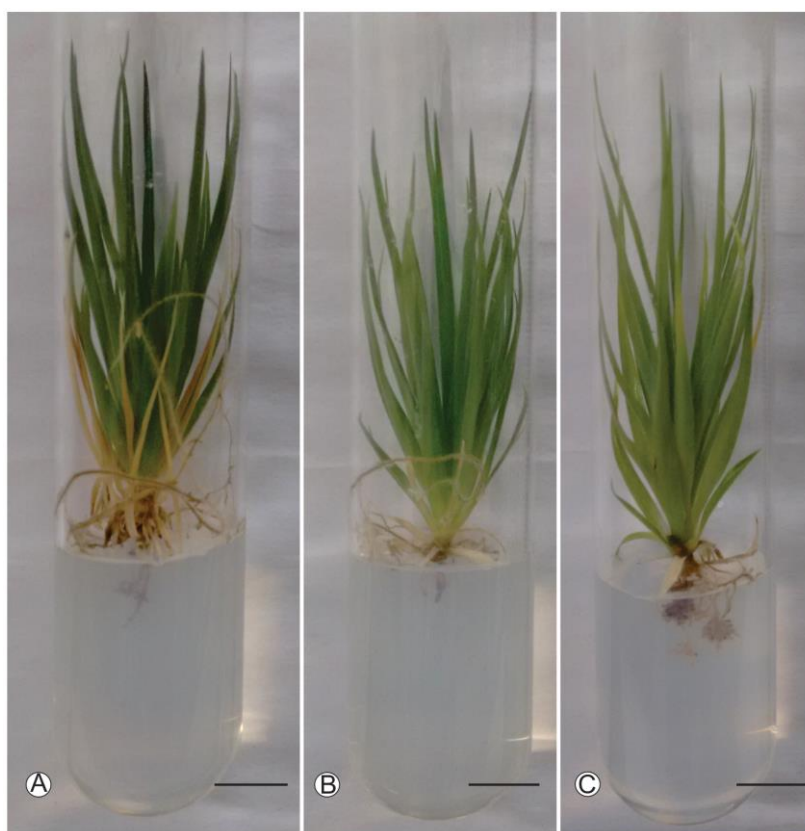


Figura 1. Plantas de *O. mucugense* conservadas *in vitro* por 300 dias com redução de sais do meio MS, (A) Controle - MS $\frac{1}{2}$; (B) T1 - MS $\frac{1}{3}$; (C) T2 - MS $\frac{1}{4}$. Escala 1 cm. Fonte: Autora (2016).

Para o NFV a média obtida no tratamento T1 apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais tratamentos, indicando que a redução para $\frac{1}{3}$ das concentrações de sais de MS no meio de cultura promove um maior NFV em relação às

reduções para $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ dessas concentrações (Tabela 1); o que é vantajoso, pois disponibiliza uma maior quantidade de explantes foliares para serem utilizados na regeneração *in vitro*.

Tabela 1. Efeito da redução de sais do meio MS no número de folhas verdes (NFV) das plantas de *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* durante 300 dias.

| Tratamento | Redução de sais | NFV |
|------------|------------------|---------|
| Controle | MS $\frac{1}{2}$ | 25,33 b |
| T1 | MS $\frac{1}{3}$ | 33,73 a |
| T2 | MS $\frac{1}{4}$ | 25,73 b |

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

A maior média obtida neste estudo para NFV 33,73 na concentração de $\frac{1}{3}$ de sais MS é superior às médias apresentadas nos estudos de conservação *in vitro* realizados por Santa-Rosa (2010) com *Aechmea leptantha*, *Aechmea blanchetiana* e *Aechmea distichantha* e por Garcia (2013) com *Aechmea blancheteana* nos quais também foi indicada a redução para $\frac{1}{3}$ das concentrações salinas do meio MS com médias para NFV de 15,17; 10,57; 11,38, e 2,96 respectivamente para cada espécie.

As concentrações salinas também foram testadas por Rocha (2010) que utilizou o meio de cultura com as concentrações completas dos sais MS e reduzidas pela metade (MS $\frac{1}{2}$) e concluiu que a redução para MS $\frac{1}{2}$ pode ser utilizada na conservação *in vitro* das espécies *Aechmea distichantha* Lem. var. *distichantha*, *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker var. *bromeliifolia*, *Aechmea multiflora* L.B.Sm e *Hohenbergia catingae* Ule var. *catingae*, no entanto obteve na presença de 30 g.L⁻¹ de sacarose médias de número de folhas verdes inferiores a registrada neste estudo.

Além das análises de crescimento realizadas nas plantas conservadas após um período *in vitro*, é importante avaliar se estas plantas mantêm sua viabilidade, contudo esta avaliação não é frequentemente realizada nos estudos de conservação *in vitro*. É imprescindível que estas coleções *in vitro* de plantas possuam capacidade regenerativa para que possam ser uma fonte prontamente disponível de material genético para intercâmbio de germoplasma, estudos de multiplicação *in vitro*, melhoramento genético, e para que deste modo possam ser fonte de propagação da espécie ou ser doadora de genes. Para que isto se torne viável é necessário que sejam realizados estudos que testem a competência celular dos tecidos destas plantas por meio da indução da regeneração *in vitro*, o que foi feito neste trabalho.

Em geral as plantas conservadas neste estudo mantiveram sua capacidade regenerativa e apresentaram altas taxas de explantes responsivos tanto pelo método de organogênese direta a partir de explantes caulinares, quanto por calogênese em explantes foliares e radiculares, o

que é de grande interesse visto que a formação de calos com capacidade morfo genética pode gerar maiores taxas proliferativas em trabalhos de multiplicação.

Avaliando a capacidade regenerativa das plantas conservadas com redução de sais a análise de variância apontou efeito significativo ($p \leq 0,05$) dos tratamentos para porcentagem de explantes responsivos a formação de brotos (%ERB), e não significativa para o número de brotos por explante (NBE) a partir de segmentos caulinares (Tabela 5 do apêndice B), que apresentou médias de 2,73 a 6,06 brotos. Observa-se na tabela 2 que para %ERB as maiores médias foram obtidas nos tratamentos T1 e T3 que não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do T2 (Figura 2).

Tabela 2. Porcentagem de explantes responsivos a formação de brotos (%ERB) sobre efeito de 2,60 μM de ANA em segmentos caulinares de plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos de redução de sais.

| Meio de Conservação | Regeneração | |
|---------------------|---|---------|
| | Tratamento 2,60 μM de ANA | %ERB |
| MS $\frac{1}{2}$ | T1 | 86,66 a |
| MS $\frac{1}{3}$ | T2 | 53,33 b |
| MS $\frac{1}{4}$ | T3 | 86,66 a |

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

Em relação à porcentagem de explantes foliares responsivos a formação de calos (%EFRC) a análise de variância demonstrou efeito não significativo ($p \geq 0,05$), sendo que foram obtidas altas porcentagens que variaram de 83,33 a 100% (Tabela 6 do apêndice B). Para a porcentagem de explantes radiculares responsivos a formação de calos (%ERRC) houve efeito significativo ($p \geq 0,05$) dos tratamentos testados (Tabela 6 do apêndice B). Para esta variável a taxa obtida no tratamento oriundo da redução de sais para $\frac{1}{3}$ (T2) 41,66% foi significativamente superior à do T1 12,49%, e não diferiu estatisticamente do T3 24,99% (Tabela 3).

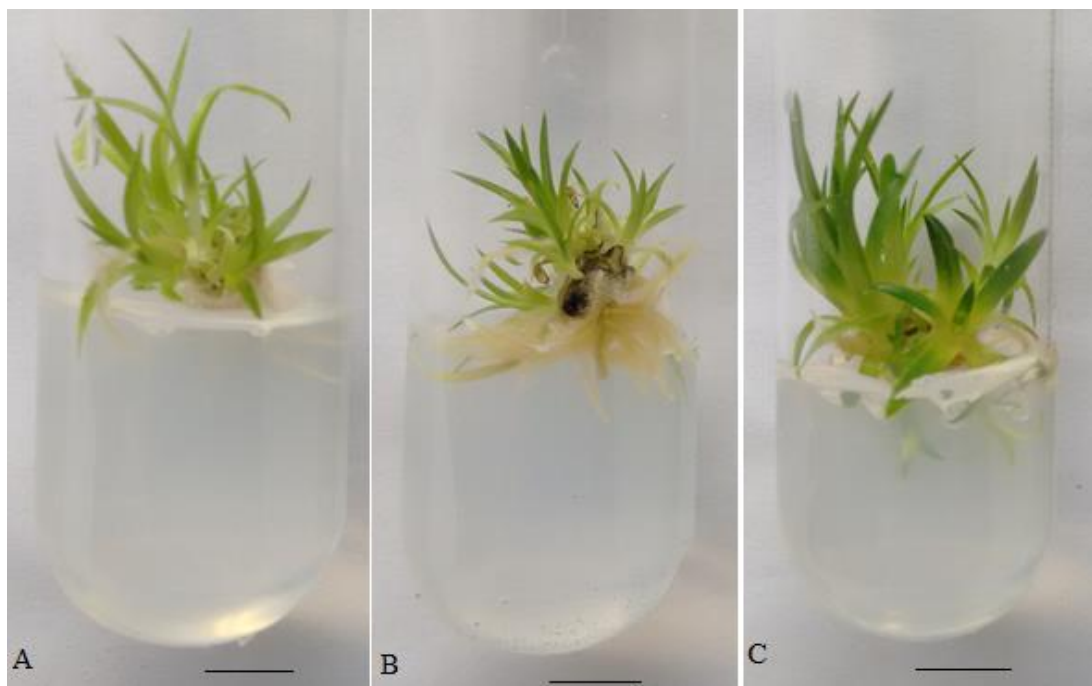


Figura 2. Formação de brotos em explantes caulinares oriundos de plantas conservadas *in vitro* por 300 dias em redução de sais. (A) T1; (B) T2; (C) T3. Escala 1 cm. Fonte: Autora (2016).

Tabela 3. Porcentagem de explantes radiculares responsivos a formação de calos (%ERRC) sobre o efeito de $5,0 \mu\text{M}$ de 2,4-D em segmentos de plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos de redução de sais.

| Meio de Conservação | Tratamentos | %ERRC |
|---------------------|-------------|----------|
| MS $\frac{1}{2}$ | T1 | 12,49 b |
| MS $\frac{1}{3}$ | T2 | 41,66 a |
| MS $\frac{1}{4}$ | T3 | 24,99 ab |

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

Em geral, os resultados obtidos na capacidade regenerativa das plantas conservadas em redução de sais tanto para %ERB e %EFRC quanto para NBE se assemelham aos resultados apresentados nos experimentos de multiplicação do capítulo 1, visto que foram utilizadas na regeneração as concentrações mais significativas dos reguladores para cada tipo de explante obtidas na organogênese direta e calogênese.

Para o teor de clorofila os resultados encontrados não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos para clorofila *a*, *b* e clorofila total. Isto permite concluir que a redução de sais para MS $\frac{1}{3}$ é indicada para conservação *in vitro* de *O. mucugense* já que garante a sobrevivência das plantas em crescimento mínimo, a utilização dos explantes na multiplicação, e não exerce influência significativa no teor de clorofila.

No experimento utilizando agentes osmóticos a análise de variância demonstrou efeito significativo ($p \leq 0,05$) para as variáveis NFV, NFS, CPA, CMR, NR, MFR, MSPA e MSR, e

não significativo ($p \geq 0,05$) para MFPA (Tabela 7 do apêndice B). Assim como no experimento com redução de sais também não houve formação de brotos em nenhum dos tratamentos testados durante o período de conservação, e as plantas apresentaram desenvolvimento morfológico normal e aspecto vigoroso (Figura 3).



Figura 3. Plantas conservadas *in vitro* por 300 dias com agentes osmóticos (A) Controle; (B) T1; (C) T2; (D) T3; (E) T4. Escala 1 cm. Fonte: Autora (2016).

Lima-Brito et al. (2011) testando agentes osmóticos e temperaturas na conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* subsp. *mucugensis* obtiveram formação de brotos com maiores médias na combinação de sacarose e sorbitol ou manitol, o que diverge do presente estudo no qual não houve formação de brotos.

Para o NFV as médias obtidas nos tratamentos T3 e T4 os quais tiveram sacarose e manitol combinados foram superiores as dos tratamentos T1 e T2 suplementados com as maiores concentrações de sacarose, mas não diferiram estatisticamente entre si e do controle (Tabela 4). Estes resultados divergem do encontrado por Garcia (2013) na conservação *in vitro* de *Aechmea blancheteana* no qual não obteve efeito significativo da sacarose e do manitol para o NFV. Já nos trabalhos de conservação *in vitro* realizados por Lima-Brito et al. (2011) com *S. mucugensis* e Albuquerque (2013) com *Comanthera curralensis* obtiveram menor porcentagem de folhas verdes respectivamente na presença do manitol, e na utilização combinada de manitol e sacarose, sendo que ambos divergem dos resultados apresentados neste trabalho com *O. mucugense*.

Tabela 4. Efeito dos agentes osmóticos sacarose e manitol no número de folhas verdes (NFR), número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), massa fresca da raiz (MFR), massa seca parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) das plantas *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* durante 300 dias.

| Tratamento | Sacarose | Manitol | NFV | NFS | CPA (cm) | CMR (cm) |
|------------|----------|---------|----------|-----------|----------|----------|
| Controle | 30 | 0 | 36,06 ab | 16,26 abc | 5,51 b | 3,74 b |
| T1 | 45 | 0 | 27,33 bc | 21,00 a | 6,02 ab | 6,48 a |
| T2 | 60 | 0 | 25,20 c | 19,06 ab | 6,72 a | 7,26 a |
| T3 | 30 | 7,8 | 37,93 a | 5,46 c | 5,82 ab | 3,57 b |
| T4 | 45 | 7,8 | 39,26 a | 10,73 bc | 5,87 ab | 5,74 ab |
| | | | NR | MFR (g) | MSPA (g) | MSR (g) |
| Controle | 30 | 0 | 4,93 b | 0,03 b | 0,06 b | 0,00 bc |
| T1 | 45 | 0 | 6,46 ab | 0,05 ab | 0,08 ab | 0,02 ab |
| T2 | 60 | 0 | 7,26 a | 0,08 a | 0,09 a | 0,02 a |
| T3 | 30 | 7,8 | 6,86 ab | 0,04 b | 0,06 b | 0,00 c |
| T4 | 45 | 7,8 | 7,53 a | 0,05 ab | 0,07 ab | 0,01 abc |

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

Para o NFS a média obtida no T3 (5,46) com sacarose e manitol foi estatisticamente inferior as médias dos tratamentos T1(21,00) e T2 (19,06), e não diferiu estatisticamente do T4 (10,73), também composto por estas duas substâncias, e ambos não diferiram do controle (16,26) (Tabela 4). De acordo com Canto et al. (2004) a senescência não é desejável na conservação *in vitro*, pois demanda que seja realizado subcultivo para recuperação do vigor da planta, e para que desse modo a mesma não perca sua capacidade de regeneração. Posto que, a senescência foliar causa degradação dos conteúdos celulares e destruição de algumas organelas, provocando perda da energia potencial da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Para CPA a média 5,51 obtida no controle com 30 g.L⁻¹ de sacarose foi significativamente inferior à do T2 (6,72) com a maior concentração de sacarose 60 g.L⁻¹ (tabela 4), indicando que a maior concentração utilizada desta substância não promoveu um aumento do potencial osmótico que ocasionasse um menor crescimento da planta, o que se observou foi um maior comprimento da parte aérea, o que não é desejável, visto que o principal objetivo da conservação *in vitro* é a redução do crescimento da planta para aumentar o tempo de permanência desta no mesmo meio de cultura, diminuindo consequentemente os subcultivos.

Este resultado contrapõe o obtido por Lima-Brito et al. (2011) na conservação *in vitro* de *S. mucugensis* no qual a maior concentração de sacarose utilizada (60 g.L⁻¹) gerou média para CPA inferior às médias registradas em menores concentrações (15 e 30 g.L⁻¹) desta substância. Como observado para *O. mucugense*, Garcia (2013) trabalhando com *A. blancheteana* também encontrou maiores médias para CPA com o uso da sacarose, e obteve as

menores médias 2,56 e 2,53 com a utilização isolada do manitol em 15 e 30 g.L⁻¹ respectivamente, que são inferiores a menor média gerada neste estudo. Moreira (2008) trabalhando com *Aechmea fasciata* apresentou a maior média com o uso de 30 g.L⁻¹ de sacarose, já o uso de concentrações menores desta substância não diferiu das médias obtidas apenas com manitol, porém a autora observou que o CPA foi reduzido com menor média de 3,98 com manitol usado isoladamente, inferior às médias obtidas neste trabalho com *O. mucugense*. Já Albuquerque (2013) na conservação *in vitro* de *C. curralensis* obteve menor CPA com o uso combinado de sacarose e manitol.

As médias para CMR obtidas nos tratamentos controle com 30 g.L⁻¹ de sacarose e T3 com sacarose e manitol não diferiram entre si e foram significativamente inferiores às dos tratamentos T1 e T2 os quais continham as maiores concentrações de sacarose (45 e 60 g.L⁻¹, respectivamente), e não diferiram também do T4 (Tabela 4). Para o NR os tratamentos T2 e T4 apresentaram médias significativamente superiores à do controle (Tabela 4).

Nota-se que as médias para MFR e MSPA tiveram o mesmo comportamento com a maior média no tratamento T2 que continha a maior concentração de sacarose, e diferiu estatisticamente do T3 e do controle os quais continham a menor concentração desta substância (30 g.L⁻¹), mas não apresentou diferença significativa do T1 e T4 (Tabela 4). As médias dos tratamentos T1, T2 e T4, com as maiores concentrações de sacarose (45 e 60 g.L⁻¹), não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram os maiores valores para MSR (Tabela 4). Os resultados obtidos para MSPA diferem do encontrado por Albuquerque (2013) na conservação *in vitro* de *C. curralensis* no qual as maiores médias para esta variável foram obtidas na presença de 15 ou 30 g.L⁻¹ de sacarose.

A massa seca representa a quantidade de carbono incorporada pela planta, desse modo nota-se para massa seca da parte aérea e da raiz que as maiores médias foram obtidas na presença das maiores concentrações de sacarose utilizadas 45 e 60 g.L⁻¹ independente da presença do manitol; o que indica que provavelmente o manitol não é metabolizado pela espécie em estudo e que a sacarose foi a fonte de carbono utilizada pela planta. Isto corrobora Santos et al. (2011) que afirmaram que a sacarose adicionada ao meio de cultura é uma fonte de carbono prontamente disponível para planta proporcionando um maior desenvolvimento da mesma.

A utilização da sacarose no meio de cultura até determinada concentração pode favorecer o desenvolvimento das plantas, após esta concentração ótima tanto o crescimento quanto as respostas fisiológicas das mesmas podem ser alterados devido à mudança do potencial osmótico do meio (FLORES et al., 2013). Neste experimento a maior concentração de sacarose

utilizada isoladamente 60 g.L⁻¹ (T2) favoreceu o crescimento e desenvolvimento das plantas conservadas, enquanto o uso combinado de sacarose e manitol em 45 g.L⁻¹ e 7,8 g.L⁻¹ (T4) foi mais efetivo na indução do crescimento mínimo e com um bom desenvolvimento das plantas visto que as médias para NFV, NR, MSPA e MSR obtidas neste tratamento estão entre as melhores, podendo ser indicado para a conservação *in vitro* de *O. mucugense*. Contudo, concentrações mais altas de sacarose podem ser testadas a fim de que essa substância possa atuar isoladamente como agente osmótico no meio de cultura, já que a utilização desta é economicamente mais favorável do que a do manitol.

O manitol é um açúcar álcool de seis carbonos (MACHADO et al., 2011) que geralmente não é metabolizado pelas plantas, portanto não pode ser utilizado como fonte de carboidrato, e quando adicionado ao meio deve ser associado a uma quantidade suficiente de sacarose que forneça a energia necessária às plantas (GEORGE, 1993). Desse modo, o manitol é frequentemente utilizado na cultura de tecidos de plantas devido ao seu efeito osmótico (AKULA; AKULA; BATESON, 2000). Este composto simula uma condição de déficit hídrico no meio, além de não possuir efeito tóxico, e ser quimicamente inerte (ÁVILA et al., 2007).

Testando a capacidade regenerativa das plantas conservadas sobre efeito dos agentes osmóticos, a análise de variância não foi significativa ($p \geq 0,05$) para porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos (%ER) e número de brotos por explante (NBE) a partir de explantes caulinares (Tabela 8 do apêndice B). No entanto, foram obtidas altas taxas de explantes responsivos que variaram de 73 a 100%, com médias de 3,13 a 5,13 para NBE (Figura 4).

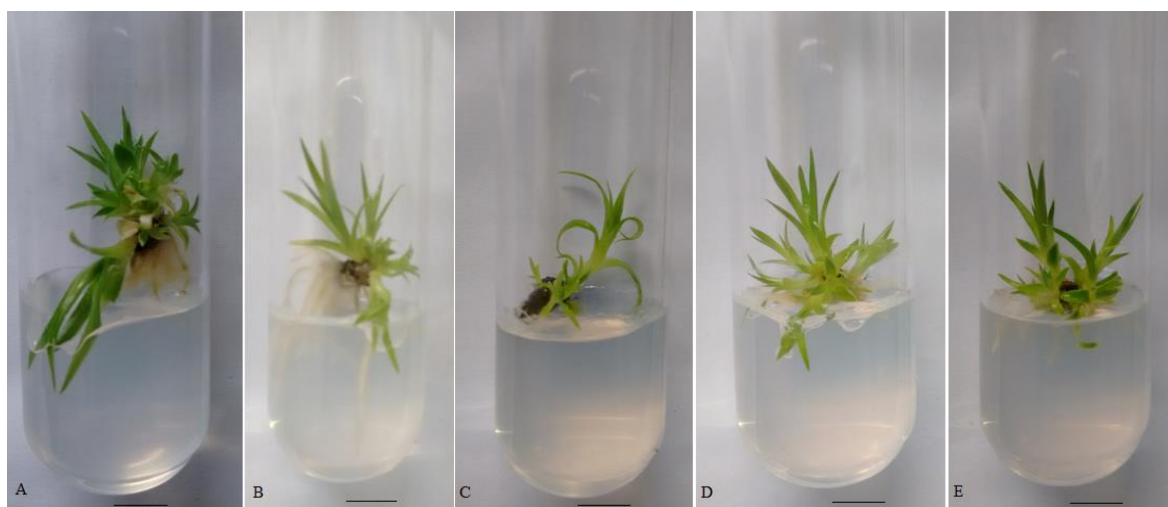


Figura 4. Formação de brotos em explantes caulinares oriundos de plantas conservadas *in vitro* por 300 dias com agentes osmóticos. (A) T1; (B) T2; (C) T3; (D) T4; (E) T5. Escala 1 cm. Fonte: Autora (2016).

Para porcentagem de explantes foliares responsivos a formação de calos (%EFRC) e explantes radiculares responsivos a formação de calos (%ERRC) a análise de variância foi significativa ($p \leq 0,05$) e não significativa ($p \geq 0,05$), respectivamente (Tabela 9 do apêndice B).

As melhores médias para %EFRC foram obtidas para as plantas provenientes dos tratamentos T2, T3, T4 e T5 e não diferiram estatisticamente entre si, mas apresentaram diferença significativa em relação ao T1 (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de explantes foliares responsivos a formação de calos (%EFRC) sobre efeito de 5,0 μM de 2,4-D com 2,5 μM de BAP em segmentos foliares de plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos com agentes osmóticos.

| Meio de Conservação | | Regeneração | |
|---------------------|---------|--|---------|
| Sacarose | Manitol | Tratamentos 5 μM 2,4-D + 2,5 μM BAP | %EFRC |
| 30 | 0 | T1 | 24,99 b |
| 45 | 0 | T2 | 75,00 a |
| 60 | 0 | T3 | 91,66 a |
| 30 | 7,8 | T4 | 79,16 a |
| 45 | 7,8 | T5 | 70,83 a |

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

Os resultados apresentados para a capacidade regenerativa destas plantas conservadas por 300 dias em meio com agentes osmóticos se assemelham aos obtidos nos experimentos de multiplicação do capítulo 1 no qual foram utilizados explantes de plantas com 5 meses.

Quanto ao teor de clorofila das plantas conservadas os tratamentos apresentaram diferenças significativas para clorofila *a* e clorofila total. Para clorofila *a* a média obtida no tratamento controle apresentou diferença estatística significativa das médias geradas nos tratamentos T2 e T3. Já para clorofila total o controle, suplementado com a menor concentração de sacarose 30 g.L^{-1} e com o menor potencial osmótico, apresentou média estatisticamente superior apenas à do T2, que continha a maior concentração desta substância 60 g.L^{-1} e maior potencial osmótico (Tabela 6). Esses resultados indicam que possivelmente o estresse hídrico causado pela adição de agentes osmóticos ao meio de cultura interferiu na síntese de clorofila.

Tabela 6. Teor de clorofila *a* e clorofila total das plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos com agentes osmóticos.

| Tratamento | Sacarose | Manitol | Clorofila <i>a</i> | Clorofila total |
|------------|----------|---------|--------------------|-----------------|
| Controle | 30 | 0 | 8,08 a | 12,20 a |
| T1 | 45 | 0 | 3,41 ab | 4,82 ab |
| T2 | 60 | 0 | 2,13 b | 3,62 b |
| T3 | 30 | 7,8 | 2,07 b | 4,73 ab |
| T4 | 45 | 7,8 | 4,65 ab | 7,57 ab |

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

De modo geral o tratamento T4 contendo 45 g.L⁻¹ associado a 7,8 g.L⁻¹ de manitol apresentou bons resultados para as variáveis avaliadas, apesar de não ter diferido estatisticamente do tratamento controle para o CPA, NFV, NFS e CMR, apresentou melhores médias para MSPA, MSR e NR, sendo que o elevado número de raízes é de interesse para multiplicação *in vitro*. Além disso, em relação a estes dois tratamentos citados o T4 apresentou melhor média para %EFRC, sendo indicado para conservação *in vitro* de *O. mucugense*.

A análise de variância demonstrou que o uso de ancymidol (ANC) foi significativo ($p \leq 0,05$) para porcentagem de plantas com broto (%PB) (Tabela 10 do apêndice B), NFV, CPA, CMR, NR, MFPA, MFR, MSPA, e MSR (Tabela 11 do apêndice B), e não significativo ($p \geq 0,05$) para número de brotos por planta (NBP) (Tabela 10 do apêndice B) e NFS (Tabela 11 do apêndice B). As variáveis NFV, CPA, NR, MFPA, MFR, MSPA e MSR apresentaram modelo de regressão significativo. As plantas conservadas na presença do ANC apresentaram algumas folhas da base mais curtas e largas, e em geral a coloração das folhas era verde escuro intenso, as raízes longas e ramificadas, alto comprimento da parte aérea, e presença de brotos; além disso, estas plantas apresentaram um maior consumo do meio de cultura em relação ao controle (Figura 5).

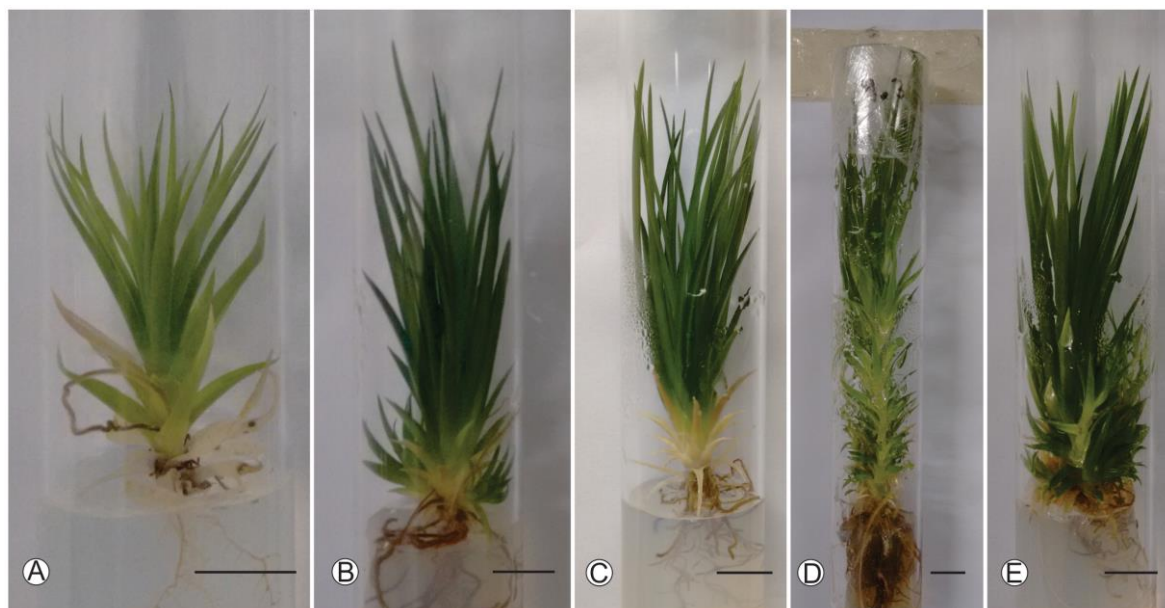


Figura 5. Plantas conservadas *in vitro* por 300 dias com diferentes concentrações (μM) de ancymidol (A) Controle; (B) T1 – 0,85; (C) T2 – 1,70; (D) T3- 2,55; (E) T4 – 3,40. Escala 1 cm. Fonte: Autora (2016).

Para o CMR a menor média foi obtida no controle e diferiu estatisticamente apenas do tratamento com $1,70 \mu\text{M}$ de ANC; os tratamentos na presença deste regulador não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 7). Observa-se que o uso do ANC promoveu um maior comprimento das raízes em relação ao meio com ausência deste regulador, contudo um elevado comprimento radicular não é desejável para conservação *in vitro*, posto que acarreta maior consumo do meio de cultura e torna laboriosa a retirada do ápice radicular.

Para o NFV a análise de regressão gerou um modelo quadrático demonstrando uma tendência a aumentar as médias conforme as concentrações de ANC aumentam, até o ponto máximo de $2,39 \mu\text{M}$ no qual atinge o valor estimado de 55,10 (Figura 6A). Este resultado difere do encontrado por Lima-Brito et al. (2015) na conservação *in vitro* de *S. mucugensis* cujos resultados apontaram um modelo linear decrescente para esta variável.

Tabela 7. Efeito do retardante de crescimento ancymidol no comprimento da maior raiz (CMR) das plantas *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* durante 300 dias.

| Tratamento | Ancymidol (μM) | CMR (cm) |
|------------|-----------------------------|----------|
| Controle | 0,00 | 4,68 b |
| T1 | 0,85 | 5,81 ab |
| T2 | 1,70 | 8,47 a |
| T3 | 2,55 | 6,09 ab |
| T4 | 3,40 | 6,99 ab |

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

O modelo quadrático de regressão demonstra para CPA que a menor média foi obtida na ausência de ANC havendo um aumento nas médias na presença deste regulador, sendo o valor máximo estimado 5,33 obtido na concentração de 2,27 μM (Figura 6B). A partir de 3,40 μM a linha aponta uma tendência a reduzir o CPA à medida que as concentrações de ANC aumentam (Figura 6B). Este resultado se assemelha ao encontrado por Canto et al. (2004) que em trabalho de conservação *in vitro* de abacaxi utilizaram o retardante de crescimento pacoblutrazol (PBZ) e concluíram que as concentrações utilizadas não foram eficientes para manter baixas taxas de crescimento. Albuquerque (2013) na conservação *in vitro* de *C. curralensis* utilizou o ANC e as concentrações usadas também não apresentaram redução eficiente das médias para esta variável aos 180 dias. Já Lima-Brito et al. (2015) obtiveram redução do CPA com o uso do ANC seguindo um modelo linear decrescente na conservação *in vitro* de *S. mucugensis* por 180 dias, o que diverge do presente estudo no qual os dados se ajustaram ao modelo quadrático e a presença do ANC não reduziu o CPA em relação ao controle.

O ANC é um antigiberélico que atua no bloqueio da síntese de giberelina (GEORGE, 1993) cuja função está relacionada ao alongamento caulinar (DOURADO NETO et al., 2004). Desse modo, o resultado obtido para CPA indica que as concentrações utilizadas não foram efetivas na redução do crescimento das plantas em conservação.

Para o NR a regressão também apresentou modelo quadrático significativo cuja linha tende a aumentar com as concentrações de ANC atingindo seu pico em 2,18 μM com valor máximo de 12,50; a partir de 2,55 μM a curva tende a decrescer (Figura 6C).

A %PB gerou taxas baixas que foram representadas em modelo quadrático de regressão demonstrando uma tendência a elevar as taxas de plantas com brotos à medida que as concentrações de ANC forem aumentadas a partir de 2,55 μM (Figura 6D). Este resultado corrobora Lima-Brito et al. (2015) que também obtiveram baixas taxas para %PB na conservação *in vitro* de *S. mucugensis* com o uso do ANC e PBZ, indicando que estes reguladores tiveram pouco efeito na proliferação da espécie. No entanto, ainda segundo estes autores, estes reguladores tem promovido em várias plantas ornamentais altas porcentagem de formação de brotos.

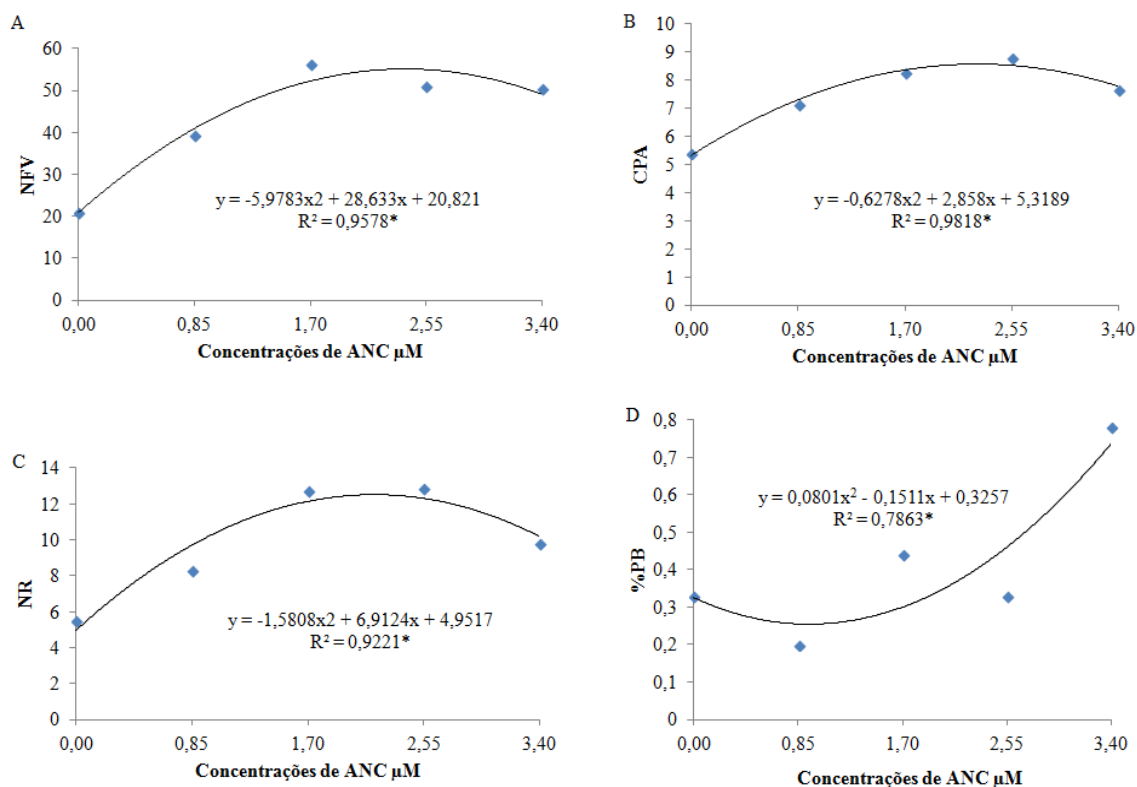


Figura 6. Número de folhas verdes – NFV (A); Comprimento da parte aérea – CPA (cm) (B); Número de raízes – NR (C) e Porcentagem de plantas com brotos - %PB (D) em função de diferentes concentrações de ancymidol na conservação *in vitro* de *Orthophytum mucugense* após 300 dias de cultivo. *Significativo a 5% de probabilidade.

As variáveis massa fresca da parte aérea e da raiz também são representadas por curva quadrática (Figura 7). Na MFPA esta curva alcança seu pico em 2,47 μM de ANC com maior média de 1,40, e tende a decrescer diminuindo as médias à medida que as concentrações de ANC aumentam a partir de 3,40 μM (Figura 7A). O mesmo comportamento é observado na Figura 7C para MFR cuja curva atinge seu ponto máximo em 2,44 μM com maior valor estimado de 0,45.

A MSPA apresentou a menor média na ausência do ANC e a linha mostra uma tendência ao aumento das médias à medida que as concentrações deste regulador são elevadas até o ponto de 2,37 μM obtendo valor máximo de 0,12; a partir de 3,40 μM a média decai e a curva tende a manter essa redução ao passo que as concentrações aumentam (Figura 7B). Para MSR a curva se apresentou ascendente até a concentração de 3,40 μM , e seu valor máximo de 0,03 é estimado no ponto de 3,15 μM de ANC (Figura 7D).

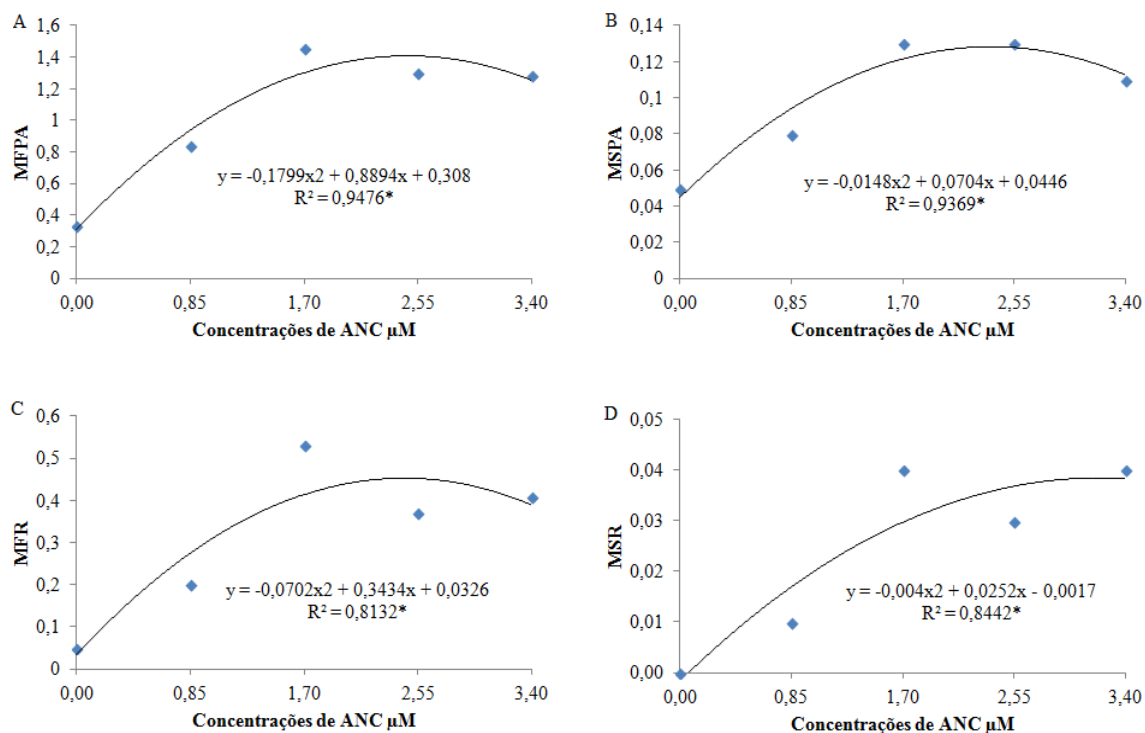


Figura 7. Massa fresca da parte aérea – MFPA (g) (A); Massa seca parte aérea – MSPA (g) (B); Massa fresca da raiz – MFR (g) (C) e Massa seca da raiz – MSR (g) (D) em função de diferentes concentrações de ancymidol na conservação *in vitro* de *Orthophytum mucugense* após 300 dias de cultivo. *Significativo a 5% de probabilidade.

Quanto à capacidade regenerativa das plantas conservadas em diferentes concentrações de ANC a análise de variância apontou efeito significativo ($p \leq 0,05$) para a porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos (%ERB) e para o número de brotos por explantes (NBE) (tabela 12 do apêndice B).

Os tratamentos T2, T3 e T5 apresentaram médias 86,66% que foram significativamente superiores ao T1 e não diferiram entre si e do T4 para %ERB (Tabela 8); para o NBE os tratamentos T3 e T5 apresentaram diferença significativa em relação ao T1 e não diferiram estatisticamente entre si e dos tratamentos T2 e T4 (Tabela 8) (Figura 8).

Tabela 8. Porcentagem de explantes responsivos a formação de brotos (%ERB) e número de brotos por explante (NBE) sobre efeito de 2,60 μM de ANA em segmentos caulinares de plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos com ANC.

| Meio de Conservação | | Regeneração | |
|-----------------------------|------------|-------------|---------|
| Ancymidol (μM) | Tratamento | %ERB | NBE |
| 0,00 | T1 | 40,00 b | 1,73 b |
| 0,85 | T2 | 86,66 a | 3,80 ab |
| 1,70 | T3 | 86,66 a | 6,60 a |
| 2,55 | T4 | 78,57 ab | 4,71 ab |
| 3,40 | T5 | 86,66 a | 6,20 a |

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

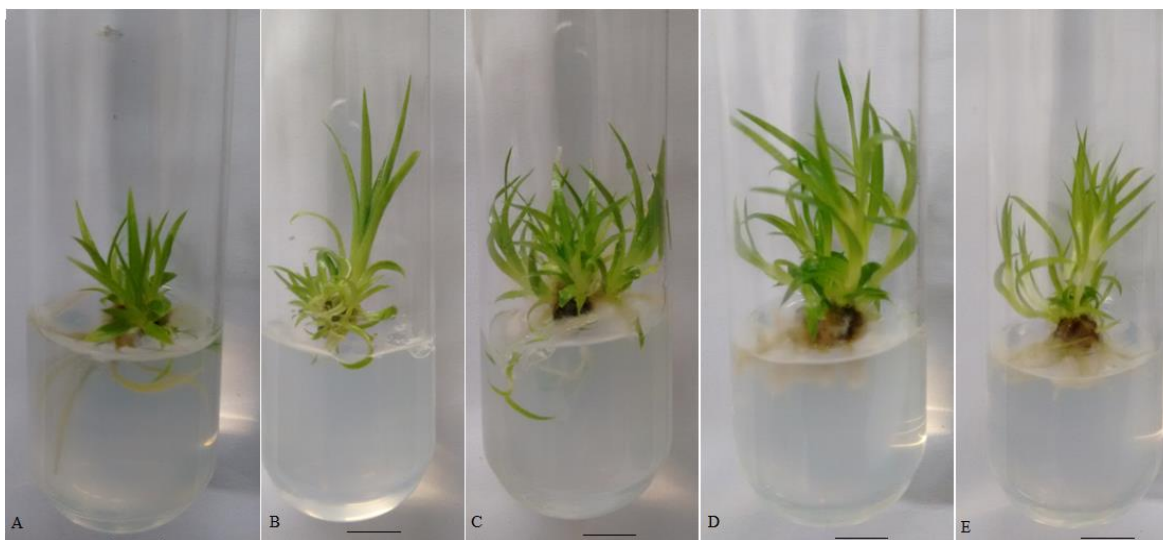


Figura 8. Formação de brotos em explantes caulinares oriundos de plantas conservadas *in vitro* por 300 dias em diferentes concentrações de ancymidol (A) T1; (B) T2; (C) T3; (D) T4; (E) T5. Escala 1 cm. Fonte: Autora (2016).

As variáveis %EFRC e %ERRC foram significativas ($p \leq 0,05$) de acordo com a análise de variância (Tabela 13 do apêndice B). As médias dos tratamentos T2, T3 e T4 foram significativamente superiores a do T1 e não diferiram estatisticamente entre si e do T5 para a variável %EFRC (Tabela 9).

Tabela 9. Porcentagem de explantes foliares responsivos a formação de calos (%EFRC) sobre o efeito de 5,0 μM de 2,4-D com 2,5 μM de BAP em segmentos de plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos com ANC.

| Meio de Conservação | | Regeneração | |
|--------------------------------|--|-------------|----------|
| Ancymidol (μM) | Tratamentos 5,0 μM 2,4-D + 2,5 μM BAP | | %EFRC |
| 0,00 | T1 | | 29,16 b |
| 0,85 | T2 | | 79,16 a |
| 1,70 | T3 | | 79,16 a |
| 2,55 | T4 | | 75,00 a |
| 3,40 | T5 | | 54,16 ab |

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

Já para %ERRC apenas os tratamentos T5 e T4 diferiram significativamente entre si, sendo que este último apresentou a maior média 45,83% (Tabela 10).

Tabela 10. Porcentagem de explantes radiculares responsivos a formação de calos (%ERRC) sobre o efeito de 5,0 μM de 2,4-D em segmentos de plantas conservadas por 300 dias em diferentes tratamentos com ANC.

| Meio de Conservação | | Regeneração | |
|--------------------------------|--|-------------|----------|
| Ancymidol (μM) | Tratamentos 5,0 μM 2,4-D | | %ERRC |
| 0,00 | T1 | | 20,83 ab |
| 0,85 | T2 | | 24,99 ab |
| 1,70 | T3 | | 33,33 ab |
| 2,55 | T4 | | 45,83 a |
| 3,40 | T5 | | 4,16 b |

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

Em geral, os resultados apresentados para capacidade regenerativa dos explantes oriundos das plantas conservadas com ANC, se assemelham aos obtidos nos experimentos de multiplicação do capítulo 1, exceto para o explante radicular provenientes das plantas conservadas que apresentou médias inferiores.

Estes resultados possibilitam inferir que os explantes oriundos das plantas conservadas com o uso de ANC foram mais eficientes na manutenção da viabilidade regenerativa do que os procedentes das plantas conservadas na ausência deste regulador. No entanto, as concentrações de ANC utilizadas não foram efetivas na indução do crescimento mínimo, devendo ser testadas outras concentrações deste regulador.

CONCLUSÃO

A redução para $\frac{1}{3}$ das concentrações salinas do meio MS permite a conservação *in vitro* de *O. mucugense* por 300 dias.

A associação de 45 g.L⁻¹ de sacarose com 7,8 g.L⁻¹ de manitol possibilita a conservação *in vitro* de *O. mucugense* por um período de 300 dias.

As concentrações de ancymidol utilizadas não foram eficientes na indução do crescimento mínimo de *O. mucugense*.

REFERÊNCIAS

- AKULA, A.; AKULA, C.; BATESON, M. Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). **Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 3, p. 241-246, 2000.
- ALBUQUERQUE, M. M. S. **Micropropagação e conservação *in vitro* de “sempre vivas” nativas da chapada diamantina – BA**. 100f. 2013. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santa – BA, 2013.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts -polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.
- ÁVILA, M. R. et al. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 98-106, 2007.
- BELLINTANI, M. C. **Estudos da propagação *in vitro* e *ex vitro* de *Neoregelia mucugensis* Leme, *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição e *Orthophytum albopictum* Philcox, espécies de Bromeliaceae endêmicas da Bahia**. 2006. 115p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.
- CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.
- DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. International Potato Center, 1985.
- DOURADO NETO, D. et al. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da FZVA**, v. 11, n. 1, 2004.
- FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* NE Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 267-270, 2006.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR** Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003. V.3, n.4.
- FERREIRA, L. M. dos S. L.; BELLINTANI, M. C.; SILVA, L. B. da. Anatomia Foliar de *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 825-827, 2007.
- FIGUEIREDO, M. de L. et al. *In vitro* establishment and conservation of *Aechmea bambusoides* LB Smith & Reitz, a threatened bromeliad species from Brazil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 14, n. 1, p. 99-103, 2008.
- FLORES, R. et al. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, 2013.
- FORTES, G. R. de L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, 2001.

- GARCIA, F. R. **Micropropagação e conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2013. 80f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana - BA, 2013.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1. The Technology, 2nd. Ed. Exegetics Limited, Edington, Wilts, London, 1993.
- LEMOS, E. E. P. de, et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.
- LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de semente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011.
- LIMA-BRITO, A. et al. Plant growth regulators for *in vitro* minimal growth of *Comanthera mucugensis*. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.11, n.1, p. 11-18, 2015.
- LIMA, C. O. de C. et al. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense* Direct organogenesis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.2, p.249-254, fev, 2012.
- LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. das G. L. A new species of *Orthophytum* (Bromeliaceae) from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2011.
- LUTHER, H. E. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials, **The Bromeliad Society International**, The Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota, Florida, USA., ed. 7, 2008.
- MACHADO, J. B. et al. Desenvolvimento de método analítico por polarimetria para doseamento de manitol em matéria-prima e solução injetável aplicado à indústria farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 3, p. 203-207, 2011.
- MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 61f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciência Agrárias e Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas – BA, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PEIXOTO, A. P.B.; FARIA, G. A.; MORAIS, A.R. Modelos de regressão com platô na estimativa do tamanho de parcelas em experimento de conservação *in vitro* de maracujazeiro. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1907-1913, 2011.
- POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 273-279, 2004.
- RADEMACHER, W. Growth retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.501-531, 2000.

ROCHA, M. A. C. **Multiplicação e conservação de Bromeliáceae Ornamentais**. 2010. 99f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2010.

SÁ, A. de J.; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.1, p.57-62, jan, 2011.

SANTA ROSA, S. **Propagação e conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental**. 2010. 86f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

SANTOS, M. da C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista ciência agrônômica (Brasil)**. v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SILVA, J. de A. et al. Identificação de áreas insubstituíveis para conservação da Cadeia do Espinhaço, estados de Minas Gerais e Bahia, Brasil. **Megadiversidade**, v. 4, p. 272-309, 2008.

SILVA, T. L.da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 384-389, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2013.

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merril. cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, p. 69-73, 2007.

THAKUR, R. et al. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. **Plant Cell Report**, v.25, p.382-391, 2006.

VERSIEUX, L. M. et al. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 98-110, 2008.

VERSIEUX, L. M.; WENDT, T. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 11, p. 2989-3009, 2007.

WANDERLEY, M. das G. L.; CONCEIÇÃO, Abel Augusto. Notas Taxonômicas e uma nova espécie do gênero *Orthophytum* Beer (Bromeliaceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus** (Série Ciências Biológicas), Feira de Santana, v. 6, n. 1, p.3-8, 2006.

CONCLUSÃO GERAL

A cultura de tecidos é uma ferramenta viável para propagação *in vitro* de *O. mucugense*.

A técnica de micropropagação via organogênese direta foi eficiente para a produção de mudas de *O. mucugense*.

A organogênese indireta possibilitou a formação de brotos de *O. mucugense* a partir do explante caulinar.

A calogênese foi induzida em explantes radicular e foliar basal, desse modo, sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas a fim de avaliar a capacidade organogênica e/ou embriogênica destes calos.

As concentrações de ancymidol utilizadas na conservação *in vitro* não foram eficientes na indução do crescimento mínimo.

A conservação *in vitro* pelo método de crescimento mínimo é efetiva para *O. mucugense*, sendo indicada a redução da concentração de sais para MS $\frac{1}{3}$, com o uso combinado de sacarose e manitol.

APÊNDICE A

Tabela 1. Experimento I: Resumo da análise de variância para porcentagem de explante com brotos (%EB) e número de brotos por explante (NBE) em função das concentrações de BAP e ANA.

| Fontes de variação | GL | Quadrados médios | |
|--------------------|----|--------------------------|------------------------|
| | | %EB | NBE |
| BAP | 4 | 185.225932 ^{ns} | 53.230525* |
| ANA | 2 | 3571.385257* | 115.719697* |
| BAP x ANA | 8 | 107.420374 ^{ns} | 9.986171 ^{ns} |
| Resíduo | 60 | | |
| CV (%) | | 16.90 | 46.06 |

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Experimento II: Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes enraizados (%EE), número de raiz (NR) e comprimento da maior raiz (CMR) em função dos tratamentos de 30 e 60 dias.

| Fontes de variação | GL | Quadrados médios | | |
|--------------------|----|---------------------|-------|----------|
| | | %EE | NR | CMR |
| Tratamentos | 1 | 562,5 ^{ns} | 10** | 192,94** |
| Resíduo | 38 | | | |
| CV (%) | | 13,46 | 31,86 | 18,99 |

**Altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Experimento III: Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência (%S) das plantas transplantadas após 120 dias.

| Fontes de variação | GL | Quadrados médios |
|-----------------------------|----|----------------------|
| | | %S |
| Tempo de enraizamento (TE) | 1 | 125.00 ^{ns} |
| Tipos de aclimatização (TA) | 1 | 125.00 ^{ns} |
| TE x TA | 1 | 125.00 ^{ns} |
| Resíduo | 76 | |
| CV (%) | | 20.12 |

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Porcentagem de explantes com calo (%EC), broto (%EB) e número de brotos por explante (NBE) sobre efeito de BAP e ANA em explantes foliares basais de *Orthophytum mucugense*.

| Fonte de variação | | Quadrados médios | | |
|-------------------|----|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | %Ec ^t | %EB ^t | NB ^z |
| BAP | 4 | 0,114568 ^{ns} | 0,549431 ^{**} | 0,405421 ^{**} |
| ANA | 2 | 3,959585 [*] | 0,670512 ^{**} | 0,468766 ^{**} |
| BAP*ANA | 8 | 0,075957 ^{ns} | 0,169755 ^{**} | 0,148848 ^{**} |
| Resíduo | 60 | | | |
| CV(%) | | 59,07 | 89,26 | 24,10 |

^{**}Altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade. ^{*}Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns}não significativo ao nível de 5% de probabilidade. ^t Dados submetidos à transformação em arco-seno. ^z Dados submetidos à transformação em Raiz quadrada de Y+0,5.

Tabela 5. Experimento V: Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes com calo (%EC) em função das concentrações de 2,4D, BAP e tipos de explantes.

| Fontes de variação | GL | Quadrados médios |
|--------------------|-----|------------------------|
| | | %EC |
| 2,4D | 4 | 20129.33 ^{**} |
| BAP | 2 | 2312.16 ^{**} |
| EXP | 1 | 541.50 ^{ns} |
| 2,4D x BAP | 8 | 580.08 ^{ns} |
| BAP x EXP | 2 | 23131.50 ^{**} |
| 2,4D x EXP | 4 | 730.66 ^{ns} |
| 2,4D x BAP x EXP | 8 | 1614.41 ^{**} |
| Resíduo | 120 | |
| CV (%) | | 33.05 |

^{**}Altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns}não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE B

Tabela 1. Análise de variância da porcentagem de sobrevivência (%S) das plantas de *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* durante 300 dias por Redução de sais.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios |
|-------------------|----|-------------------------|
| | | % Sobrevivência |
| Tratamento | 2 | 20,833333 ^{ns} |
| Resíduo | 27 | |
| CV (%) | | 4,6 |

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Análise de variância da porcentagem de sobrevivência (%S) das plantas de *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* durante 300 dias por Agentes osmóticos.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios |
|-------------------|----|-------------------------|
| | | % Sobrevivência |
| Tratamento | 2 | 12,500000 ^{ns} |
| Resíduo | 45 | |
| CV (%) | | 3,55 |

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Análise de variância da porcentagem de sobrevivência (%S) das plantas de *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* durante 300 dias por ANC.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios |
|-------------------|----|-------------------------|
| | | % Sobrevivência |
| Tratamento | 2 | 12,500000 ^{ns} |
| Resíduo | 45 | |
| CV (%) | | 3,55 |

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Análise de variância das variáveis número de folhas verdes (NFV) e senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), e massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) das plantas de *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* com redução de sais.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | | | | |
|-------------------|----|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| | | NFV [*] | NFS ^{ns} | CPA ^{ns} | CMR ^{ns} | NR ^{ns} |
| Tratamento | 2 | 336,800000 | 107,02222 | 1,07467 | 2,282889 | 8,86667 |
| Resíduo | 42 | | | | | |
| CV (%) | | 27,65 | 50,72 | 17,44 | 47,69 | 29,82 |
| | | MFPA ^{ns} | MFR ^{ns} | MSPA ^{ns} | MSR ^{ns t} | |
| Tratamento | 2 | 0,051530 | 0,000194 | 0,00094 | 0,000061 | |
| Resíduo | 42 | | | | | |
| CV (%) | | 44,70 | 53,31 | 36,08 | 1,10 | |

^{*}Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^tDados submetidos à transformação em Raiz quadrada $Y+0,5$.

Tabela 5. Análise de variância da capacidade regenerativa de explantes caulinares de plantas conservadas por 300 dias com redução de sais.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | |
|-------------------|----|------------------|--------------------|
| | | %ER* | NB ^{ns t} |
| Tratamento | 2 | 5555,55556 | 2,658945 |
| Resíduo | 42 | | |
| CV (%) | | 54,80 | 53,87 |

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^t Dados submetidos à transformação em Raiz quadrada Y+0,5.

Tabela 6. Análise de variância da capacidade regenerativa de explantes foliares e radiculares de plantas conservadas por 300 dias com redução de sais.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | |
|-------------------|----|---------------------|-------------|
| | | %EFRC ^{ns} | %ERRC* |
| Tratamentos | 2 | 601,800929 | 1713,231504 |
| Resíduo | 21 | | |
| CV (%) | | 19,53 | 82,12 |

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade;

Tabela 7. Análise de variância das variáveis número de folhas verdes (NFV) e senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), e massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) das plantas de *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* com agentes osmóticos.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | | | | |
|-------------------|----|--------------------|---------------------|----------|---------------------|-------|
| | | NFV** | NFS ^{** t} | CPA* | CMR** | NR* |
| Tratamento | 4 | 621,88667 | 13,315023 | 3,043 | 40,684533 | 15,68 |
| Resíduo | 70 | | | | | |
| CV (%) | | 26,75 | 36,21 | 16,87 | 45,62 | 33,67 |
| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | | | | |
| | | MFPA ^{ns} | MFR** | MSPA** | MSR ^{** t} | |
| Tratamento | 4 | 0,012588 | 0,004273 | 0,002852 | 0,000334 | |
| Resíduo | 70 | | | | | |
| CV (%) | | 43,05 | 57,95 | 34,37 | 1,26 | |

** Altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade; *Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^t Dados submetidos à transformação em Raiz quadrada Y+0,5.

Tabela 8. Análise de variância da capacidade regenerativa de explantes caulinares de plantas conservadas por 300 dias com agentes osmóticos.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | |
|-------------------|----|-------------------|--------------------|
| | | %ER ^{ns} | NB ^{ns t} |
| Tratamentos | 4 | 1533,333333 | 0,748325 |
| Resíduo | 70 | | |
| CV (%) | | 46,03 | 50,54 |

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^t Dados submetidos à transformação em Raiz quadrada Y+0,5.

Tabela 9. Análise de variância da capacidade regenerativa de explantes foliares e radiculares de plantas conservadas por 300 dias com agentes osmóticos.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | |
|-------------------|----|------------------|-----------------------|
| | | %EFRC** | %ERRC ^{ns t} |
| Tratamentos | 4 | 5180,556140 | 0,374253 |
| Resíduo | 35 | | |
| CV (%) | | 32,2 | 89,07 |

**Altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade. ^{ns}não significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^t Dados submetidos à transformação em arco seno.

Tabela 10. Análise de variância das variáveis porcentagem de plantas com brotos (%PB) e número de brotos por planta (NBP) das plantas de *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* com ancymidol.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | |
|-------------------|----|------------------|--------------------|
| | | %PB* | NB ^{ns t} |
| Tratamento | 4 | 0,482108 | 0,072458 |
| Resíduo | 45 | | |
| CV (%) | | 73,73 | 28,36 |

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^t Dados submetidos à transformação em Raiz quadrada Y+0,5.

Tabela 11. Análise de variância das variáveis número de folhas verdes (NFV) e senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), e massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) das plantas de *Orthophytum mucugense* conservadas *in vitro* com ancymidol.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | | | | |
|-------------------|----|------------------|-------------------|--------------------|-----------|--------------------|
| | | NFV** | NFS ^{ns} | CPA** | CMR** | |
| Tratamento | 4 | 2973,980000 | 69,020000 | 25,430200 | 30,175533 | |
| Resíduo | 70 | | | | | |
| CV (%) | | 40,06 | 33,18 | 26,56 | 45,03 | |
| | | NR** | MFPA** | MFR** ^t | MSPA** | MSR** ^t |
| Tratamento | 4 | 143,813333 | 3,110732 | 0,152207 | 0,015366 | 0,001883 |
| Resíduo | 70 | | | | | |
| CV (%) | | 33,71 | 37,75 | 15,14 | 31,20 | 2,00 |

**Altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^t Dados submetidos à transformação em Raiz quadrada Y+0,5.

Tabela 12. Análise de variância da capacidade regenerativa de explantes caulinares de plantas conservadas por 300 dias com ANC.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | |
|-------------------|----|------------------|---------------------|
| | | %ERB** | NBE ^{ns t} |
| Tratamentos | 4 | 6161,19691 | 3,519176 |
| Resíduo | 69 | | |
| CV (%) | | 53,14 | 47,3 |

**Altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade. ^t Dados submetidos à transformação em Raiz quadrada Y+0,5.

Tabela 13. Análise de variância da capacidade regenerativa de explantes foliares e radiculares de plantas conservadas por 300 dias com ANC.

| Fonte de variação | GL | Quadrados médios | |
|-------------------|----|------------------|----------|
| | | %EFRC** | %ERRC* t |
| Tratamentos | 4 | 3778,401416 | 0,508396 |
| Resíduo | 35 | | |
| CV (%) | | 35,58 | 99,29 |

** Altamente significativo. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade; tDados submetidos à transformação em arcoseno.