

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E CONSERVAÇÃO DE  
ESPÉCIES ENDÊMICAS E VULNERÁVEIS DE  
BROMELIÁCEAS**

**Simone Sacramento dos Santos Silva**

**CRUZ DAS ALMAS- BAHIA  
2018**

# MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES ENDÊMICAS E VULNERÁVEIS DE BROMELIÁCEAS

**Simone Sacramento dos Santos Silva**

Licenciatura em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

**Orientadora:** Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**Coorientadores:** Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Dr. Everton Hilo de Souza

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586m	<p>Silva, Simone Sacramento dos Santos. Multiplicação <i>in vitro</i> e conservação de espécies endêmicas e vulneráveis de bromeliáceas / Simone Sacramento dos Santos Silva. Cruz das Almas, BA, 2018. 90f.; il.</p> <p>Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa. Coorientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Bromélia – Germinação. 2.Bromélia – Propagação in vitro. 3.Conservação ambiental – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Souza, Everton Hilo de. III.Título.</p> <p>CDD: 635.9</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.  
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).  
Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES  
ENDÊMICAS E VULNERÁVEIS DE BROMELIÁCEAS**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Simone Sacramento dos Santos Silva

Aprovado em: 25 de Maio de 2018

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Daniela Garcia Silveira  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano- Campus Alagoinhas

Dr.<sup>a</sup>. Tatiana Góes Junghans  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

## DEDICATÓRIA

A Luan meu filho, a razão do meu viver. Te amo.

A William, companheiro imprescindível, que me ajuda todos os dias a ser um ser humano cada vez melhor.

Amo vocês para sempre!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por dedicarem as suas vidas para proporcionar sempre na medida do possível as melhores instituições de ensino para mim e para meus irmãos o que possibilitou a minha inserção no Ensino Superior. Amo muito vocês.

Ao meu companheiro William, que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida e o qual dedica parte da sua vida para proporcionar a mim e ao nosso filho as melhores alegrias e ensinamentos de que todo ser humano merece ter direitos iguais e condições de vida humanitária. Você é um ser humano fantástico. Te amo!

Ao meu filho. Ah! Meu pequeno, falar de você é pensar em lutar cada dia mais por dias melhores para todos. Sua presença em minha vida faz entender o verdadeiro sentimento do amor. Mil vidas eu tenha, em todas elas quero que você seja meu filho. Te amo além dessa vida.

Aos meus irmãos Sidney e Carla, obrigada pelo carinho, companheiros e pelo amor dedicado. Vocês são fundamentais na minha vida.

A minha querida orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, que aceitou a dura tarefa da orientação e, sobretudo muito importante na construção do conhecimento. Muito obrigada por tudo, pela paciência, contribuições, conselhos, atenção, carinho e amizade.

A Dr<sup>a</sup> Fernanda Vidigal Duarte Souza pela coorientação, apoio, atenção, ensinamentos transmitidos, compreensão, amizade e pelo apoio nesses últimos dias para construção desse material.

Ao Dr. Everton Hilo de Souza a você meu querido amigo, muito obrigada. Pela coorientação, mas ainda pela sua amizade, pelo seu comprometimento, cuidado, atenção, dedicação, carinho. Pelo apoio nessa reta final na construção do material, você foi fundamental. Obrigada de coração.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos amigos da turma 2016.1 da pós-graduação. Em especial aqueles que se fizeram mais presente, a minha querida amiga Poliana que sempre esteve do meu lado, Silvana, Thiago, Matheus, Taís muito obrigada por tudo.

Aos amigos do laboratório de cultura de tecidos da UFRB: Maria Josirene, Priscila, Fábio, Afonso, Cris. E as duas que foram fundamentais com a ajuda, com o carinho e a amizade; Moema e Ila a vocês muito obrigada por tudo.

A todos os funcionários da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em especial aos amigos do laboratório de cultura de tecidos: Helder, Wagner, Rafa, Taíse Paixão, Manassés, Taíse Rodrigues, Ronilse, Cíntia, Fabi. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma na construção desse material.

A minha querida amiga Dani, por todo cuidado, carinho, ajuda em vários momentos desse percurso, você é muito especial.

Aos participantes da banca examinadora de qualificação, pela importante contribuição.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura por ceder o laboratório de cultura de tecidos onde foi realizado parte dos trabalhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de Mestrado.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pelo espaço de ensino gratuito, oferecido para a realização de parte do trabalho desenvolvido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Edital PROCAD – 2013), pela concessão de auxílio financeiro e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/USP e ao Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas, na pessoa da Profa. Adriana Pinheiro Martinelli e Mônica Lanzoni Rossi, CENA/USP pela infraestrutura para realização dos trabalhos de microscopia eletrônica de varredura.

A todas as pessoas que não cito aqui, mas não menos importantes, e que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho; serei sempre grata.

Muito Obrigada!

## MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES ENDÊMICAS E VULNERÁVEIS DE BROMELIÁCEAS

**RESUMO:** Bromélias nativas da Mata Atlântica brasileira apresentam grande potencial ornamental, tornando muitas delas ameaçadas de extinção pelo extrativismo predatório. Informações básicas sobre essas espécies são essenciais para subsidiar a condução de programas de conservação, que aliadas à ferramentas biotecnológicas permitem a preservação dessa biodiversidade. Nessa perspectiva, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de produção de mudas *in vitro*, assim como avaliar dois modelos de conservação (*in vitro* e criopreservação) para bromélias em situação de vulnerabilidade. De forma complementar, avaliar o desenvolvimento pós-seminal de três espécies de bromélias. No primeiro capítulo, abordou-se a micropropagação e a conservação *in vitro* da espécie *Alcantarea nahoumii*. Para o ensaio de germinação *in vitro*, sementes maduras foram coletadas, desinfestadas e inoculadas em placas de Petri, contendo 15 mL de MS, MS/2 e MS/3 suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® em quatro regimes de temperaturas (20, 25, 30, 35°C) em câmara climatizada de germinação (B.O.D). Para o experimento de micropropagação *in vitro*, segmentos da plântula, foram estabelecidos em placas de Petri, contendo 20 mL do meio de cultura MS, acrescido com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, suplementado com 0,5 µM de ANA (ácido 1-naftalenoacético) e 0,0; 2,2; 4,4 e 6,6 µM de BAP (6-benzilaminopurina). Para a conservação *in vitro*, plântulas com aproximadamente 2 cm de comprimento, provenientes da germinação *in vitro*, foram estabelecidas em tubos de ensaio, contendo 10 mL dos meios de cultura MS e MS/2 com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e suplementado com 15 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose onde permaneceram por 24 meses. No segundo capítulo, o objetivo foi avaliar o efeito da criopreservação em sementes de três espécies endêmicas e vulneráveis: *Vriesea bahiana*, *Hohenbergia castellanosiie* *Encholirium spectabile*, assim como proceder ao estudo de desenvolvimento pós-seminal das mesmas. Mediante os resultados podemos dizer que, as sementes da *A. nahoumii* apresentaram maiores taxas de germinação nas condições de temperatura 20°C e 25°C com o meio de cultura MS. As plantas podem ser conservadas *in vitro* sob condição de crescimento lento por 24 meses quando incubadas em meio de cultura MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Na micropropagação, o meio de cultura MS na ausência de regulador vegetal ou quando suplementado com 2,2 µM de BAP associado a 0,5 µM de ANA proporcionam as maiores taxas de multiplicação. A aclimatização das plântulas ocorreu com elevada taxa de sobrevivência. Para o segundo capítulo, as sementes de *E. spectabile* e *H. castellanosiie* podem ser criopreservadas com 7,2% e 2,2% respectivamente de umidade quando dessecadas por 2h. Para as sementes de *V. bahiana* apresentaram quebra de dormência após a criopreservação e podem ser criopreservadas com 5,9% de umidade quando dessecadas por 24h. Esses resultados são promissores para a criopreservação dessas espécies e podem ser ajustados para outras espécies. Para análise do desenvolvimento pós-seminal, verificou-se variadas fases das três espécies em estudo.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae; Conservação; Micropropagação; Criopreservação; Desenvolvimento pós-seminal.

## **IN VITRO MULTIPLICATION AND CONSERVATION OF ENDEMIC AND VULNERABLE SPECIES OF BROMELIACES**

**ABSTRACT:** Bromeliads native to remnant Atlantic Forest areas in Brazil have high ornamental potential, causing many species to be endangered due to predatory extraction. Basic information about these species is essential to support conservation programs, which allied with biotechnologies allow the preservation of this biodiversity. In this respect, the present work describes the development of a protocol for *in vitro* production of seedlings and evaluates two preservation models (*in vitro* and cryopreservation) for bromeliads in vulnerable situations. The first chapter covers micropropagation and *in vitro* conservation of the species *Alcantarea nahoumii*. For the *in vitro* germination test, mature seeds were collected, disinfested and inoculated in Petri dishes containing 15 ml each of MS, MS/2 and MS/3 culture media supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose, solidified with 2 g L<sup>-1</sup> of Phytigel® in four temperature regimes (20, 25, 30, 35 °C) in a BOD chamber. For the *in vitro* micropropagation experiment, plant segments were established in Petri dishes containing 20 mL of MS culture medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose, solidified with 2 g L<sup>-1</sup> of Phytigel® plus 0.5 µM of ANA (1-naphthalene acid) and 0.0, 2.2, 4.4 or 6.6 µM of BAP (6-benzylaminopurine). For *in vitro* conservation, plantlets with approximate length of 2 cm, obtained from the *in vitro* germination, were established in test tubes containing 10 mL each of MS and MS/2 culture media with 2 g L<sup>-1</sup> of Phytigel® and supplemented with 15 g L<sup>-1</sup> or 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose, where they remained for 24 months. The second chapter describes the effect of the cryopreservation of seeds of three endemic and vulnerable species: *Vriesea bahiana*, *Hohenbergia castellanosii* and *Encholirium spectabile*, as well as their post-seminal development. The results showed that the seeds of *A. nahoumii* had the highest germination rates at temperatures of 20 °C and 25 °C with MS culture medium. The plants can be preserved *in vitro* under slow growth condition for 24 months when incubated in MS medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose. In the micropropagation tests, the MS medium in the absence of the growth regulator or when supplemented with 2.2 µM of BAP associated with 0.5 µM of ANA produced the highest multiplication rates. The acclimatization of the plantlets occurred with a high survival rate. Furthermore, the seeds of *E. spectabile* and *H. castellanosii* can be cryopreserved with 7.2 and 2.2% moisture when desiccated for 2 h, respectively. In turn, the seeds of *V. bahiana* presented dormancy breakage after cryopreservation and could be cryopreserved with moisture of 5.9% when desiccated for 24 h. These results are promising for cryopreservation of these species, and the protocol can be adjusted for other species.

**Keywords:** Bromeliaceae; Conservation; Micropropagation; Cryopreservation; Post-Seminal development.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Alcantarea nahoumii</i> (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE), UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DA FLORESTA ATLÂNTICA, BRASIL.....	33
<b>CAPÍTULO II</b>	
DESENVOLVIMENTO PÓS- SEMINAL E CRIOPRESERVAÇÃO DE BROMÉLIAS CONSIDERADAS ENDÊMICA E EM RISCO DE EXTINÇÃO.....	58
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>87</b>

## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae envolve um grande número de espécies e gêneros, com distribuição em todos os ecossistemas brasileiros, porém sua maior diversidade está no bioma Mata Atlântica (FORZA et al., 2013). A grande concentração das espécies de bromélias ocorre na América do Sul e estima-se que no Brasil tenha ocorrência de 50% das espécies e 73% dos gêneros (DINIZ; FERREIRA, 2000). Das espécies catalogadas, muitas só vegetam aqui e encontram-se ameaçadas de extinção.

As bromeliáceas, de um modo geral, são notáveis devido à sua diversidade ecológica e pelo alto poder de adaptação aos diferentes habitats, podendo ser encontradas em ambientes desérticos, quentes e secos, e até mesmo em florestas úmidas e regiões montanhosas frias (BENZING, 2000). Apresentam hábitos diversificados, diferenciando-se em espécies epífitas, terrestres, ou mesmo rupícolas, o que faz dessa família uma das mais adaptáveis do mundo (BENZING, 2000).

A subfamília Bromelioideae é a mais diversa da família, composta por 32 gêneros e mais de 934 espécies. Em sua grande maioria, as espécies são epífitas e têm a característica de uma roseta central formando um acúmulo de água em seu interior. Normalmente, possuem folhas espinhosas e frutos do tipo bagas com sementes protegidas por uma carapaça. É a subfamília de maior importância econômica, pois inclui o gênero *Aechmea*, que apresenta espécies de grande valor ornamental, bem como o gênero *Ananas*, ao qual pertence o abacaxi, o representante de maior impacto econômico pelo consumo de seus frutos (SMITH; DOWNS, 1979; SASS; SPECHT, 2010).

Entretanto, o uso ornamental reconhecido dessas espécies, tanto no Brasil como no resto do mundo, levaram à uma impactante atividade extrativista que tem resultado em grande perda de diversidade de várias espécies de bromélias. Aliado a isso, desmatamentos por causas variadas e fatores abióticos como queimadas têm causado uma erosão genética em vários gêneros demandando ações que visam minimizar essa situação. Algumas espécies endêmicas já encontram-se em listas de

espécies ameaçadas de extinção, deixando evidente a fragilidade de muitos ecossistemas que abrigam plantas dessa família.

A produção de mudas para oferta no mercado, pode diminuir as atividades extrativistas, assim como estratégias de conservação de populações naturais podem minimizar essa perda registrada entre as bromeliáceas.

Em vista disso, essa dissertação, que está composta de dois capítulos, visa o desenvolvimento de um protocolo de produção de mudas, por meio da micropropagação e do estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro* e criopreservação de sementes. De forma complementar, avalia o desenvolvimento pós-seminal de três espécies de bromélias. O foco do trabalho são espécies de bromeliáceas que são endêmicas do Brasil e estão ameaçadas de extinção.

O capítulo I aborda a germinação, micropropagação e conservação *in vitro* da espécie *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant, uma bromélia que vegeta na região nordeste da Bahia e que vem desaparecendo do seu habitat natural. Este estudo teve por objetivo avaliar a germinação *in vitro* de sementes dessa espécie e estabelecer um protocolo de micropropagação com vistas a produção de plantas em larga escala e a conservação *in vitro* sob crescimento lento.

O capítulo II aborda a técnica da criopreservação de sementes das espécies *Vriesea bahiana* Leme, *Encholirium spectabile* Mart. ex Schut f., e *Hohenbergia castellanosii* L.B.Sm. & Read que são endêmicas do nordeste da Bahia e ameaçadas de extinção. Em paralelo, foi realizado o desenvolvimento pós-seminal dessas espécies.

Espera-se que a partir desses resultados seja possível contribuir para minimizar os riscos de erosão genética de várias espécies em situação de risco, já que os protocolos obtidos podem ser aplicados a outras bromélias.

## REVISÃO DE LITERATURA

### A família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae Juss compreende 75 gêneros em 3.578 espécies (GOUDA et al., 2018). Porém, com a descrição de novas espécies e o crescente estudo da família esses números vêm aumentando ao longo dos anos.

Tradicionalmente são aceitas três subfamílias em Bromeliaceae: Bromelioideae, Tillandsioideae, Pitcairnioideae (SMITH; DOWNS, 1974; 1977; 1979), sendo que as duas primeiras monofiléticas (TERRY et al., 1997; HORRES et al., 2007; GIVNISH et al., 2004, 2007, 2011). Assim, baseando-se em estudos filogenéticos e moleculares, Givnish et al. (2007; 2011) propuseram uma nova divisão para a família, na qual os diferentes clados referentes à antiga Pitcairnioideae, são tratados como diferentes subfamílias. Desta forma, esta família passa a ter oito subfamílias: Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Bromelioideae, e Tillandsioideae.

A família se constitui de uma grande variedade de formas de vida: terrestre, tanque em forma de roseta e epífitas (a grande maioria) (MARTINELLI et al., 2008). A evolução da transição das plantas terrestres para o tipo epífitas está diretamente ligada a formação de tricomas especializados que recobrem as superfícies foliares, cuja função é refletir o excesso de luminosidade e retardam a transpiração, reduzindo o calor causado pelo sol. Essa estratégia é uma adaptação muito importante para as epífitas, devido as suas estruturas morfológicas com tamanho reduzido e herbáceo, hábito rizomatoso, caule fitotélmico, suculentas, além de diversos mecanismos de polinização, dispersão de sementes para adaptação em diferentes habitats e sistema radicular reduzido (BENZING, 2000).

Essas plantas apresentam importância ecológica por ser fonte de recursos para a vida selvagem, servindo de abrigo para reprodução e instalação de uma flora e fauna (BALKE et al., 2008). Além disso, são plantas com valor ornamental, devido à beleza de suas folhas e flores, muito cultivadas e utilizadas em decorações de interior e projetos paisagísticos (DAL VESCO et al., 2011).

O fator mais importante para a adaptação de bromélias a ambientes áridos se dar pelo seu metabolismo do tipo CAM (Crassulacean Acid Metabolism) (CRAYN et al., 2004). Esse tipo de metabolismo é eficiente para economizar água uma vez que os estômatos se abrem apenas a noite.

O bioma Mata Atlântica apresenta uma grande biodiversidade e endemismo de espécies e está entre os mais ameaçados, em função dos avanços dos centros urbanos e rurais do Brasil. O resultado tem sido uma perda significativa de sua biodiversidade, considerando principalmente as espécies epífitas, onde se enquadram grande parte das bromélias (WANDERLEY; MARTINS, 2007).

Como forma de atenuar esse problema é necessárias ações, tanto na direção de desenvolver estratégias de educação ambiental, como no investimento em pesquisas que possibilitem desenvolver técnicas de conservação, a fim de se evitar um cenário de erosão genética irreversível.

### **Técnicas de conservação aplicadas às bromélias**

As bromélias ornamentais tornaram-se alvos de vendas comerciais, a partir de atividades puramente extrativistas, já que não existem sistemas de produção em larga escala de mudas desses materiais para serem ofertados no mercado. Assim, o desenvolvimento de um sistema eficiente de produção de mudas pode ser uma alternativa para minimizar os danos causados pelo extrativismo predatório. A multiplicação *in vitro*, conhecida como micropropagação é uma ferramenta biotecnológica que possibilita a obtenção de um grande número de mudas em um pequeno espaço físico e curto espaço de tempo, além de garantir uma alta qualidade fitossanitária (CARVALHO et al., 2006).

Em ambientes naturais, as bromélias se propagam tanto de maneira sexuada, através da fecundação e formação de sementes ou de maneira assexuada pela emissão de brotos laterais pela planta-mãe (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). A reprodução assexuada, pela emissão de brotos laterais pode ocorrer com plantas com idades variadas, não se restringe a plantas adultas e nem todas apresentam esse tipo de reprodução (BENZING, 2000).

Entretanto, a reprodução sexuada, se dar a partir da fecundação e conseqüentemente o desenvolvimento do embrião e semente. A germinação de sementes e seu desenvolvimento são aspectos cruciais para a manutenção da

diversidade genética das plantas em seu ambiente natural, também usada na produção de plantas para o comércio (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Para fins comerciais, a propagação vegetativa natural das bromélias, pela emissão de brotos laterais é bastante lenta, devido ao pequeno número de brotos emitidos pelas plantas adultas após o florescimento (MERCIER; KERBAUY, 1995; CARNEIRO et al., 1999). Tal tipo de propagação não supre a necessidade de produção voltada para o comércio destas plantas, devido a germinação ser baixa (MERCIER; KERBAUY, 1995), e o período juvenil da planta é bastante longo (HOSOKI; ASAHIRA, 1980).

Partindo deste contexto, a propagação *in vitro* de bromélias tem sido relatada com sucesso para várias espécies como a *Vriesea reitzii* Leme & A. F. Costa (RECH FILHO et al., 2005), *Tillandsia eizii* L.B.Sm. (PICKENS et al., 2003; PICKENS et al., 2006), *Orthophytum mucugense* Wand. & A. A. Conc. e *Neoregelia mucugensis* Leme (BELLINTANI et al., 2007), *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm. e *Aechmea distichantha* Lem (SANTA-ROSA et al., 2013), assim como em bromélias do gênero *Neoregelia* L. B. Sm. (CARVALHO et al., 2011). Os protocolos são desenvolvidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* e microbrotos como explantes em sistemas semissólidos (ALMEIDA et al., 2002; ENGELMANN, 2011).

A multiplicação *in vitro* é uma das técnicas de cultura de tecidos que oferece uma alternativa à propagação vegetativa convencional, por ser uma das ferramentas mais eficiente à produção em larga escala, representando um conjunto de métodos de propagação a partir do cultivo de pequenos propágulos (células, tecidos e órgãos), em um meio de crescimento apropriado, sob condições assépticas que favoreçam a regeneração da planta (CARVALHO et al., 2006), de modo que possa, quando necessário, ser reintroduzida em campo. Este processo exige condições ambientais específicas no que tange à luminosidade, fotoperíodo, temperatura e umidade relativa (WENDLING et al., 2006), podendo ainda atender outros requisitos peculiares à espécie que será cultivada.

Por outro lado, a possibilidade de se produzir plantas *in vitro* permite, não apenas a produção de mudas, mas também pode ser a base de um banco de germoplasma *in vitro*. A conservação *in vitro* é uma estratégia que mantém as plantas de forma que possam permanecer sob condição de laboratório com o mínimo de manipulação possível, garantindo assim a identidade genética do material e a

qualidade fitossanitária (ALMEIDA et al., 2002; ENGELMANN, 2011). Há duas estratégias para este tipo de conservação, a de crescimento mínimo, que é de médio prazo e a criopreservação, de longo prazo. No primeiro caso, a conservação consiste na manutenção das plantas em meio de cultura em condições de crescimento mínimo pela manipulação de diferentes fatores que reduzam o metabolismo da planta. Esses fatores podem ser desde minimizar a disponibilidade de água no meio, pelo uso de osmorreguladores, como galactose, maltose, sorbitol, dentre outros, até o uso de reguladores vegetais como o ABA (ácido abscísico), além da modificação nas condições de incubação da cultura, a exemplo da redução da temperatura e da luminosidade (ENGELMANN, 2011).

Apesar de sua praticidade, a conservação *in vitro* requer estudos de adequação para qualquer material novo (ENGELMANN, 2011). Alguns relatos bem-sucedidos de crescimento lento *in vitro* para as bromélias pode ser observado em *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra (FREITAS et al., 2015), *Alcantarea imperialis* Harms (MOLLO et al., 2011) e *Nidularium minutum* Mez (CARVALHO et al., 2013).

O segundo caso, a criopreservação, consiste no armazenamento de estruturas vegetais em nitrogênio líquido (-196 °C), que podem ser sementes ou tecidos vegetais variados, como ápices caulinares, embriões somáticos, grãos de pólen etc. Como as condições de armazenamento provocam a parada quase total do metabolismo celular, essa conservação é considerada de longo prazo.

O congelamento de tecidos vivos demanda um tratamento que proteja a célula a partir da não formação de cristais de gelo que causam danos irreversíveis na membrana celular. Esses danos inviabilizam o resgate do material congelado (GONZALEZ-ARNAO et al., 2000).

São várias as técnicas para a criopreservação de material vegetal, incluindo as clássicas, que enfatizam a necessidade de resfriamento controlado da amostra, ainda que a dessecação, encapsulamento-vitrificação e a vitrificação em gotas estão entre as mais utilizadas por sua eficiência para várias espécies (SAKAI; ENGELMANN, 2007; SAKAI et al., 2008; SOUZA et al., 2015).

A dessecação pode ser obtida pelo cultivo dos tecidos em meios nutritivos com altas concentrações de sacarose e pode ser usado de forma isolada ou em combinação com outras estratégias, como o encapsulamento, a vitrificação, o encapsulamento-vitrificação, a vitrificação em gotas etc.

O encapsulamento consiste no revestimento em cápsulas de alginato de sódio, para proteger tecidos que podem ser mais sensíveis à temperatura ultrabaixa, e, da mesma forma, pode vir acompanhado de procedimentos de dessecação ou vitrificação (YAMAMOTO et al., 2011, 2012).

Por outro lado, a vitrificação consiste na transição da água para o estado vítreo, que é amorfo, de alta viscosidade, mas não forma cristais, responsáveis pelos maiores danos às estruturas celulares durante o congelamento (BENSON et al., 2007). Expor os tecidos às soluções específicas, como PVS2 (*Plant Vitrification Solution* nº 2) formulada a partir de 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% de dimetil sulfoxido (DMSO) (todos v/v) e 0,4 M de sacarose (SAKAI, 1990) é uma das estratégias para se adquirir o processo de vitrificação do tecido. Essa técnica é um método eficiente contra o congelamento, uma vez que as soluções crioprotetoras utilizadas são altamente concentradas a temperaturas muito baixas, causando a solidificação das estruturas de forma a permanecerem viscosas e estáveis, além de evitar a formação de cristais de gelo dentro das células.

A realização de algumas avaliações pode ajudar na compreensão dos danos causados pelas diferentes etapas da criopreservação. A avaliação fisiológica das sementes permite avaliar a extensão dos danos relacionados à viabilidade e vigor, sendo os testes de germinação e de tetrazólio, os mais utilizados em trabalhos com sementes (CLEMENTE et al., 2012; ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015.)

A conservação de sementes é a forma mais fácil, comum e eficiente de conservação *ex situ*, pois garante a variabilidade genética, são fáceis de coletar e ocupam um pequeno espaço (SANTOS, 2001; LI; PRITCHARD, 2009; GOLDFARB et al., 2010; PENCE, 2010). Além disso, o tamanho reduzido das sementes possibilita um congelamento mais eficiente, uma vez que a dessecação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (CARVALHO; VIDAL, 2003). Como as sementes são estruturas de reprodução das plantas, seu armazenamento é considerado o método mais usado na conservação *ex situ*, pois cada semente pode representar uma única planta e geneticamente diferente (HILL et al., 2013).

Com o avanço de algumas tecnologias é possível analisar o estresse e os danos causados aos tecidos após exposição ao nitrogênio líquido. Neste aspecto

ganha destaque os testes de viabilidade que permitem um prognóstico rápido e preciso dos efeitos da criopreservação (VERLEYSSEN et al., 2004).

De acordo com Engelmann (2004), existem grupos de plantas que se adaptam às técnicas de criopreservação de maneira positiva, ou seja, são capazes de sobreviver à temperatura ultra baixa, com destaque para as espécies de sementes intermediárias ou recalcitrantes, que não toleram o armazenamento por meio das metodologias convencionais (bancos de germoplasma de sementes).

Segundo Trigiano e Gray (2011), o frio pode ocasionar danos celulares em algumas espécies vegetais mesmo antes da formação de cristais de gelo. Em vista disso, o congelamento deve ser analisado em cada espécie antes de propor a criopreservação como método de conservação.

### **Espécies de bromélias em estudo**

As quatro espécies em estudo, *Alcantarea nahoumii* (Leme) R. J. Grant, *Vriesea bahiana* Leme, *Hohenbergia castellanosi* L.B.Sm. & Read e *Encholirium spectabile* Mart. ex Schut f., são nativas e endêmicas da Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, entretanto seus maiores exemplares ficam no bioma Mata Atlântica. O tamanho reduzido das bromeliáceas, hábito rizomatoso, caule fitotélmico, tricomas para absorção foliar, adaptações específicas de seu metabolismo (fotossíntese via CAM), suculentas e outras adequações xeromórficas são características que determinam o sucesso de propagação das bromélias em ambientes e situações tão diversas e, frequentemente estressantes (BENZING, 2000).

As espécies podem ser diferenciadas através do comprimento da inflorescência, pela forma das brácteas, cor e formato das pétalas, dimensão e cor das folhas e dimensão das bainhas. Os habitats mais comuns são locais rochosos e ensolarados e com baixas temperaturas durante a noite (MARTINELLI et al., 2008).

### ***Alcantarea nahoumii* (Leme) R. J. Grant**

O gênero *Alcantarea* pode ser distinguido por pétalas longas, lineares, fusiformes, espiraladas e flácidas e suas sementes são caracterizadas com ápices plumosos e apêndices basais. São plantas herbáceas, epífitas, terrestres ou rupícolas. As inflorescências são paniculadas, com flores dísticas e/ou arrançadas em um só lado, as brácteas florais são evidentes e menores que as sépalas, que são livres e

convolutas. Geralmente, os estames são mais longos que as pétalas. (VERSIEUX, 2010).

A espécie (Figura 1), é endêmica do Brasil, com distribuição geográfica de ocorrência confirmada no Nordeste da Bahia, e de domínios fitogeográficos: Caatinga e Mata Atlântica, com tipo de vegetação rupestre (REFLORA, 2018). A *Alcantarea nahoumii* (Leme) R. J. Grant pertence à subfamília Tillandsioideae, apresenta hábito rupícola, crescendo naturalmente sobre afloramentos rochosos ou solos rasos e pedregosos, sendo exposta a alta luminosidade, podendo atingir até 2,4 metros de altura, sendo considerada uma espécie de crescimento intermediário (BASTOS et al., 2017). Essa espécie é nativa da Serra da Jibóia, uma área de Floresta Tropical e Campos de Altitude, que se aproximam de 800 metros (MARTINELLI et al., 2008).

A espécie tem distribuição restrita a quatro municípios que perderam cerca de 96% da sua cobertura vegetal original, principalmente devido ao desmatamento que alimenta a produção de carvão vegetal, destinado às siderúrgicas e à indústria de cerâmica. Estima-se que ao menos 30% dessa redução populacional tenha ocorrido nos últimos 10 anos (FORZZA et al., 2013). Além disso, esses afloramentos são constantemente atingidos por incêndios. A espécie está inserida em um local singular, pois fica isolada de outros fragmentos florestais do litoral pela caatinga que a circunda (QUEIROZ et al., 1996).



**Figura1.** *Alcantarea nahoumii*: A) Planta em seu ambiente natural; B) Flor e inflorescência; C) Sementes com apêndices plumosos.

### ***Vriesea bahiana* Leme**

O gênero *Vriesea* é o terceiro maior da família Bromeliaceae, com mais de 300 espécies, destas, 98% são consideradas endêmicas ao território nacional. As plantas desse gênero são de tamanho variável e a maioria são epífitas, com folhas pêndulas ou firmes, verdes inteiras ou com manchas, densas ou cobertas por tricomas (COSTA, 2002). As inflorescências duram por um bom tempo e possuem flores de coloração verdes, amarelas e brancas e suas brácteas são coloridas e brilhantes. As inflorescências têm uma característica em formato de espiga, curvadas ou pêndulas (BLACK; DEHGAN, 2003).

O gênero *Vriesea* possui representantes em todo o bioma Mata Atlântica, sendo que sua maior diversidade é encontrada entre a Bahia e Santa Catarina (MARTINELLI et al., 2008). As espécies deste gênero são perenes, herbáceas e com folhas arranjadas em rosetas que absorvem água e nutrientes. São espécies de crescimento lento (STRINGHETA et al., 2008).

A *V. bahiana* (Figura 2), pertence à subfamília Tillandsioideae, é endêmica do Brasil e encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção. Está localizada na Serra da Jibóia, região Nordeste do estado da Bahia. É uma vegetação que se adapta

muito bem em afloramentos rochosos. Devido as ações antrópicas a mesma já está praticamente desaparecida (FORZZA et al., 2013).

A propagação vegetativa dessa espécie ocorre por brotos laterais. As folhas são do tipo roseta infundibuliforme, as inflorescências são em ramificações racemos duplos e em posição ereta. As flores nas raques são dísticas, apresentam pétalas elípticas. As cores das pétalas são amareladas/laranjas. Os estames ficam localizados na face da corola (FORZZA et al., 2013).



**Figura 2.** *Vriesea bahiana*: A) Planta em seu ambiente natural; B) Detalhe da inflorescência e flor; C) Semente com apêndices plumosos.

### ***Hohenbergia castellanosii* L.B.Sm. & Read**

De acordo com sua morfologia, o gênero apresenta maior afinidade com *Aechmea* subg. *Aechmea*, e *Hohenbergiopsis*, por compartilhar alguns caracteres semelhantes: inflorescências compostas, flores com sépalas assimétricas, pétalas com apêndices, óvulos caudados e grãos de pólen porado. Possuem escapo bem desenvolvido, brácteas escapais imbricadas. Inflorescência de espigas estrobiladas, 2-4 pinadas. Brácteas florais sempre cobrindo o ovário, estames inclusos, ovários totalmente inferiores, óvulos longos caudados. Fruto baga, semente elíptica (FORZZA et al., 2013).

*Hohenbergia catellanosii* (Figura 3), pertence à subfamília Bromelioideae, é endêmica do Brasil e ocorre no estado da Bahia, de ocorrência exclusiva entre a mesoregião metropolitana de Salvador, no extremo sul da Baía de Todos os Santos, e o litoral sul do Estado, no município de Maraú. Pode ser encontrada em trechos preservados da Praia do Garcês, na região do recôncavo Baiano (BARACHO, 2005). Essa espécie é de domínio fitogeográfico Mata Atlântica com tipo de vegetação restinga (FORZZA et al., 2013). Está sujeita ao declínio contínuo da qualidade do hábitat, devido principalmente à degradação ambiental resultante da expansão urbana das cidades e do turismo muito intenso na sua região de ocorrência. Assim ela é considerada em perigo de extinção. De domínio fitogeográfico Mata Atlântica, caracterizada por uma vegetação de restinga (FORZZA et al., 2013).

O maior problema para as restingas do litoral norte do Estado da Bahia é ocasionado pela especulação imobiliária, decorrente principalmente da sua localização próxima ao litoral, onde a ocupação humana é maior. Este fato é agravado pela posição geográfica da cidade de Salvador, situada em uma baía (a Baía de Todos os Santos, a maior do Brasil), que possui ao leste, oeste e sul o mar, impossibilitando o crescimento urbano nesses sentidos. Acresce-se a isso a decadência da ocupação imobiliária na Ilha de Itaparica, fazendo com que o fluxo de expansão imobiliária se dê principalmente em direção ao litoral norte, beneficiado recentemente com investimentos no sistema viário local (FORZZA et al., 2013).

É uma planta resistente com características interessantes conhecidas pela sua folhagem impressionante. O hábito de crescimento é robusto e ereto com folhas largas. A cor das folhas começa com um verde brilhante, então, à medida que a planta amadurece, começa a ruborizar uma cor vermelha das pontas das folhas para dentro (FORZZA et al., 2013).



**Figura 3.** *Hohenbergia castellanosii*:(A) Planta com inflorescência; B) Frutos; C) Sementes.

***Encholirium spectabile* Mart. ex Schult. & Schult.f.**

*Encholirium* é um gênero parafilético e, em sua circunscrição atual, é restrito ao território brasileiro. Ocorre exclusivamente em afloramentos rochosos, campos rupestres ou solos arenosos-pedregosos. O grupo não possui caracteres homólogos apomorfica e o caráter mais útil para distinção de *Dyckia* é a presença de pedúnculo terminal (FORZZA et al., 2013).

A hipótese filogenética apresentada por Forzza (2005), baseada apenas em dados morfológicos, sugere que *Encholirium* é parafilético e que o complexo entre os gêneros *Dyckia* e *Encholirium* constitui um clado. Nesta hipótese os índices de sustentação dos ramos são extremamente baixos e não fica claro qual seria o melhor posicionamento das espécies, atualmente mantidas em *Encholirium*. Forzza (2005) publicou a revisão completa do grupo, de modo que hoje são aceitas 27 espécies de *Encholirium*, das quais 13 são endêmicas do Brasil.

*E. spectabile* é a espécie que apresenta distribuição geográfica mais ampla. Ocorre por toda Caatinga em afloramentos rochosos e campos rupestres da Cadeia do Espinhaço da Bahia. Algumas populações podem ser encontradas em áreas de transição com o Cerrado e Floresta Atlântica, mas a espécie praticamente

circunscreve o domínio da Caatinga, onde é popularmente conhecida como macambira. Apresenta grande variação morfológica (FORZZA, 2005). Essa espécie é nativa e endêmica do Brasil.



**Figura 4.** *Encholirium spectabile*: A) Planta em ambiente natural; B) Inflorescência e flores; C) Sementes com apêndice alado.

## REFERÊNCIAS

ABREU, S. A. L.; VEIGA, D. A.; PINHO, V. R. V. E.; MONTEIRO, F. F.; ROSA, F. V. D. S. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 4, p. 399-406, 2014.

ALMEIDA, A. B. W.; SANTANA, G. S.; PINHEIRO, M. R.; COSTA, M. A. P. C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 296-300, 2002.

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. **Bromeliads**. In: SILVA, J. A. T. da (Org). Floriculture, ornamental and plant biotechnology. Tokyo: Global Science Books, v. 4, pp. 644-655, 2006.

BALKE, M.; GOMEZ, J. Z.; RIBERA, I.; VILORIA, A.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; STEINER, M.; GARCIA, L.; HENDRICH, A. P. Ancient associations of aquatic beetles and tank bromeliads in the neotropical forest canopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. p. 6356-6361. 2008.

BARACHO, G. S. **Revisão taxonômica de *Hohenbergia* Schult. & Schult. f. subg. *Hohenbergia* (Bromeliaceae)**. Tese de Doutorado (Biologia Floral). Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2005. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/17113>.

BASTOS, M. J. S. M.; BASTOS, L. P.; SOUZA, E. H.; SOARES, T. L.; MORAIS, D. V.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C. Floral and reproductive biology of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), a vulnerable endemic species of the Atlantic Forest. **Acta Botanica Brasilica**. v. 31, n. 4, p. 665-676, 2017.

BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. D. Estabelecimento in vitro de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1101-1103, 2007.

BENSON, E. E.; HARDING, K.; JOHNSTON, J. W. Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.) **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Humana Press, p. 163-184, 2007.

BENZING, D. H. Bromeliaceae: Profile and adaptive radiation. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2000. 690 p.

BLACK, R. J.; DEHGAN, B. **Bromeliads**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, 2003.

CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G.J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J. *In Vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R Graham) L. B. Smith, and endemic bromeliad from eastern Brazil. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 79-83, 1999.

CARVALHO, A. C. P. P.; SANTOS, E. O.; RODRIGUES, A. A. J. Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil. In: GERALD, L. T. S (ed.) **Biofábrica de plantas**: produção industrial de plantas *in vitro*. Atiqua, São Paulo, pp. 380-393, 2011.

CARVALHO, C. P.; HAYASHI, A. H.; BRAGA, M. R.; NIEVOLA, C. C. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. **Plant Physiology and Biochemistry**. p. 71, p. 144-154. 2013.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006, 28 p..

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande: Embrapa, 2003, 22 p.

CLEMENTE, A. C. S.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARAES, M. R. Suitability of the tetrazolium test methodology for recently harvested and stored coffee seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 415-423, 2012.

COELHO, B. V. S.; FIGUEIREDO, A. M. CLEMENTE, C. F. L.; ROSA, F. V. D. S. Physiological and biochemical changes in coffee seed dried in silica gel and saturated saline solutions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 6, p. 483-491, 2015.

COSTA, A. F. Revisão taxonômica do complexo *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae). 2002. 150p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Botânica). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 10, p. 3703-3708, 2004.

DAL VESCO, L. L. D.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p. 515-522. 2011.

DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. T. Bancos genéticos de plantas, animais e microrganismos: garantia da segurança alimentar do terceiro milênio. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. v. 13, p 34-38. mar./abr. 2000.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant**, v. 45, p. 5-16. 2011.

FORZZA, R. C. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, p. 23, p. 1-49. 2005.

FORZZA, R. C.; COSTA, A. F.; LEME, E. M. C.; VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L.; LOUZADA, R. B.; MONTEIRO, R. F.; JUDICE, D. M.; FERNANDEZ, E. P.; BORGES, R. A. X.; PENEDO, T. S. A.; MONTEIRO, N. P.; MORAES, M. A. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson & Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pp. 315-397, 2013.

FREITAS, C.; CARVALHO, V.; NIEVOLA, C. C. Effect of sucrose concentrations on *in vitro* growth and subsequent acclimatization of the native bromeliad *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra. **Biotemas**, n. 28, p. 37-42, 2015.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; RINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SIMTH, J. A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.

GIVNISH, T. K.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhf* sequence data. **Aliso**, v. 23, p. 3-26, 2007.

GIVNISH, T. K.; MILLAM, K. C.; EVANS, T. M.; HALL, J. C.; PIRES, J. C.; BARRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal. Inferences about phylogeny and south American-african disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhf* sequence data. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, p. 35-54, 2004.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 27-33, 2010.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; MARQUEZ, R. M.; VILLAVICENCIO, C. U.; MARTINEZ, M. M. E.; ENGELMANN, F. "Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification". ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Jircas International Agriculture Series, pp. 390-392, 2000.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D., GOUDA, K. **Encyclopaedia of Bromeliads Version 4**. Disponível em: <<http://bromeliad.nl/encyclopedia/>>. Acesso em: 1 Julho 2018.

HILL, L. M.; HAIBY, K. V. G.; WALTERS, C. T. "Intermediate" seed storage physiology: populus as a natural model system. **International Society for Horticultural Science Meeting**, p. 88. 2013.

HORRES, R.; SCHULTE, K.; WEISING, K.; ZIZKA, G. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – evidence from molecular and anatomical studies. **Aliso**, v. 23, p. 27-43, 2007.

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. In vitro propagation in liquid culture. *Hortscience*, p. 603-604, 1980.

LI, D.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 11, p. 614-621, 2009.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R.C. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 209- 258, 2008.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. The importance of tissue technique for conservation of endangered brazilian bromeliads from Atlantic Rain Forest canopy. Selbyana, **Sarasota**, FLA, v. 16, p. 147-149, 1995.

MOLLO, L.; MARTINS, M. C. M.; OLIVEIRA, V. F.; NIEVOLA, C. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, p. 107, p. 141-149, 2011.

PENCE, V. C. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. **Kew Bulletin**, v. 65, p. 539–547, 2010.

PICKENS, A. K; WOLF, J.; AFFOLLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eiziin vitro*. Cellular & Developmental. **Biology Plant**, v. 42, n. 4, p. 348- 353, 2006.

PICKENS, K. A.; AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eiziin vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 38, n.3 p. 101-104, 2003.

QUEIROZ, L. P.; SENA, T. S. N.; COSTA, M. J. L. S. Flora vascular da Serra da Jibóia, Santa Terezinha Bahia. I: O campo rupestre. **Sitientibus**, v. 15, p. 27- 40, 1996.

RECH FILHO, A.; VESCO, L. L. D.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V. GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p.1799-1808, 2005.

REFLORA 2018. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/>>. Acesso em: 02 Mai. 2018.

SAKAI, A; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlim:Springer, p. 53-69. 1990.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Berlim:Springer, p. 33–51. 2008.

SANTA-ROSA, S. S. F. V.; VIDAL, A. M.; LEDO, C. A. D. S.; SANTANA, J. R. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2015.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação do germoplasma vegetal. **Biociência**, v. 20, p. 60-65, 2001.

SASS, C.; SPECHT, C. D. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 559-571, 2010.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae. Part 3). **Flora Neotropica Monograph**. v.14, p.1493-2141, 1979.

SMITH, L. B.; DOWNS, R.J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae. Part 1). **Flora Neotropica Monograph**. v.14, p.1-658, 1974.

SMITH, L. B.; DOWNS, R.J. Tillandsioideae (Bromeliaceae. Part 2). **Flora Neotropica Monograph**. v.14, p. 663-1492, 1977.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A.; LEDO, C. A. S.; JENDEREK, M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant cell, Tissue and organ culture**, v. 124, n.2, p. 351- 360, 2015.

STRINGHETA, A. C. O.; SILVA, D. J. H.; CARDOSO, A. A.; FONTES, L. E. F.; BARBOSA, J. G. Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. **Acta Scientiarum**. Agronomy Maringá, v. 27, n. 1, p. 165-170, 2005.

TERRY, R. G.; BROWN, G. K.; OLMSTEAD, R. G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhf*. **American Journal of Botany**, v. 84, p. 664-670, 1997.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. Plant tissue culture, development and biotechnology. **London**: CRC Press, p. 583, 2011.

VERLEYSSEN, H.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 77, n. 1, p.11-21, 2004.

VERSIEUX, L. M.; ELBL, P.M.; WANDERLEY, M. G. L.; MENEZES, N. L. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. **Nordic Journal of Botany**, Malden, v.28, p.385-397, 2010.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006, 56 p.

YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; FUKUI, K.; SEKIZAWA, K.; NIINO, T. V. Cryoplate procedure as na effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. **CryoLetters**, v. 33, p. 12–23, 2012.

YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; PRIYANTHA, W.S.; FUKUI, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **Cryo Letters**, v. 32, p. 256–265, 2011.

## CAPÍTULO 1

MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE), UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DA FLORESTA ATLÂNTICA, BRASIL<sup>1</sup>

---

1. Artigo a ser submetido no periódico Brazilian Archives of Biology and Technology

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE), UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DA FLORESTA ATLÂNTICA, BRASIL**

**RESUMO:** *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant pertence à família Bromeliaceae, é nativa da Mata Atlântica e utilizada muitas vezes como planta ornamental. A micropropagação é uma das técnicas de cultura de tecidos de grande impacto por causa da sua eficiência na produção de mudas em larga escala. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *A. nahoumii* e estabelecer um protocolo de micropropagação com vistas à produção de mudas a fim de minimizar os efeitos do extrativismo predatório e viabilizar um sistema de conservação *in vitro*. Para a germinação *in vitro*, foram utilizadas sementes maduras, que foram desinfestadas e estabelecidas em placas de Petri contendo 15 mL de MS, MS/2 e MS/3 suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®. A incubação foi realizada em quatro temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C em câmara climatizada. Para o experimento de micropropagação, segmentos do caule com altura média de 0,5 cm, foram retirados de 150 plântulas com aproximadamente 4 cm de altura, obtidas do experimento de germinação. Os segmentos foram estabelecidos em placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura MS, acrescido com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, suplementado com 0,5 µM de ANA (ácido 1-naftalenoacético) e 0,0, 2,2, 4,4 e 6,6 µM de BAP (6-benzilaminopurina), subcultivados durante cinco vezes totalizando 225 dias de cultivos. Para a conservação *in vitro*, plântulas com aproximadamente 2 cm de comprimento, provenientes da germinação *in vitro*, foram estabelecidas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS e MS/2 com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e suplementado com 15 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose onde permaneceram por 24 meses. As plantas foram aclimatizadas com substrato comercial. Os resultados demonstraram que as sementes em condições de temperatura de 20 e 25 °C, com o meio de cultura MS na sua formulação completa, promoveram as maiores porcentagens de germinação. Na micropropagação, a maior taxa de multiplicação de brotos foi obtida para o tratamento sem adição do regulador vegetal ou quando combinado com a concentração de 2,2 µM de BAP + 0,5 µM de ANA. A aclimatização das plantas ocorreu com altas taxas de plantas sobreviventes. A espécie pode ser conservada *in vitro* sob condição de crescimento lento por 24 meses quando incubadas em meio de cultura MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae; Propagação *in vitro*; Conservação.

**IN VITRO CULTIVATION OF *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (BROMELIACEAE), A ENDEMIC SPECIES OF THE ATLANTIC FOREST, BRAZIL**

**ABSTRACT:** *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant belongs to the Bromeliaceae family. It is native to the Atlantic Forest biome and is often used as an ornamental plant. Micropropagation is one of the most widely used tissue culture techniques due to its efficiency in large-scale production of seedlings. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* germination of *A. nahoumii* seeds and establish a micropropagation protocol for production of seedlings, to minimize the effects of predatory extraction and develop an effective *in vitro* conservation system. Mature seeds were used for the *in vitro* germination. They were disinfested and placed in Petri dishes containing 15 mL each of MS, MS/2 and MS/3 media supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and solidified with 2 g L<sup>-1</sup> of Phytigel®. The dishes were incubated at four temperatures (20, 25, 30, 35 °C) in a BOD chamber. For the micropropagation experiment, stem segments with average length of 0.5 cm were removed from 150 plantlets with approximate height of 4 cm, obtained from the germination experiment. The segments were established in Petri dishes containing 20 mL MS culture medium plus 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose, solidified with 2 g L<sup>-1</sup> of Phytigel®, supplemented with 0.5 µM of ANA (1-naphthalene acid) and 0.0, 2.2, 4.4 or 6.6 µM of BAP (6-benzylaminopurine). For *in vitro* conservation, plantlets with approximate length of 2 cm, obtained from the *in vitro* germination, were established in test tubes containing 10 mL each of MS and MS/2 culture media with 2 g L<sup>-1</sup> of Phytigel® and supplemented with 15 g L<sup>-1</sup> or 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose, where they remained for 24 months. The results demonstrated that the seeds under temperature conditions of 20 and 25 °C, with the complete MS culture medium formulation, had the highest germination rates. In the micropropagation tests, the highest multiplication rate of shoots was obtained in the treatment without addition of the growth regulator or when supplemented with 2.2 µM of BAP plus 0.5 µM of ANA. The species can be conserved *in vitro* under slow growth condition for 24 months when incubated in MS culture medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose.

**Key words:** Bromeliaceae, In vitro propagation, Conservation.

## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae compreende 75 gêneros em 3.578 espécies (GOUDA et al., 2018) das quais 40% são encontradas em território brasileiro e 70% são endêmicas da Mata Atlântica (IBF, 2018). É considerada a segunda maior família de epífitas vasculares deste bioma (KERSTEN, 2010) e muitas figuram nas listas de espécies ameaçadas de extinção devido à degradação ambiental causada, principalmente, por atividades extrativistas e outras ações antrópicas. Dentre estas espécies, a *Alcantarea nahoumii* encontra-se na categoria de espécie “Vulnerável” à extinção (FORZZA et al., 2013), devido à frequentes queimadas na região e sua grande utilização como planta ornamental e que gerou uma demanda que tem sido atendida a partir de extrativismo e não de cultivo.

*A. nahoumii* pertence à subfamília Tillandsioideae, é uma espécie que ocorre na Bahia e sua maior população vegetando na Serra da Jibóia, Santa Teresinha (VERSIEUX; WANDERLEY, 2010; FORZZA et al., 2013). A espécie tem hábito rupícola, crescendo naturalmente sobre afloramentos rochosos ou solos rasos e pedregosos, podendo atingir até 3,5 metros de altura. A inflorescência é curto-paniculada, bipinada, com flores dísticas alternadas, expandida na região proximal, com cerca de 3,5 centímetros de comprimento (VERSIEUX et al., 2010).

As sementes de Tillandsioideae são pequenas, leves e apresentam adaptações morfológicas que aumentam a razão superfície/ volume, reduzindo a velocidade de queda (PAULA; SILVA, 2004). Os apêndices plumosos auxiliam a fixação das sementes em troncos e cascas de árvores garantindo o sucesso de sua dispersão (SCATENA et al., 2006). Estudos que envolvem a germinação de sementes, além de contribuir para a diferenciação de grupos taxonômicos (ROSA et al., 2005) também auxiliam no processo de conservação das mesmas (ANDRADE et al., 2003), bem como, para estudos sobre regeneração em ecossistemas naturais, uma vez que, a germinação ou a emergência e o estabelecimento das plântulas, são estágios críticos no ciclo de vida das plantas (MELO; VARELA, 2006).

A temperatura tem sido considerada como um dos principais fatores responsáveis, tanto pela porcentagem final de germinação, como pelo índice de

velocidade de germinação (IVG), por afetar especialmente, a velocidade de absorção de água e a reativação das reações metabólicas, fundamentais aos processos de mobilização de reservas e a retomada de crescimento do embrião (COELHO et al., 2011).

O uso de técnicas biotecnológicas nessa família tem sido uma alternativa aplicada para a conservação e que pode ir desde a germinação de sementes *in vitro* até técnicas de crescimento lento para manutenção das plantas em condições ideais de conservação. A germinação de sementes *in vitro* pode ser potencializada, permitindo altas porcentagens de germinação em um tempo curto, quando comparada ao ambiente natural, além de proporcionar a manutenção da variabilidade genética da população (PINTO et al., 2010).

A conservação de germoplasma das bromélias deve considerar sempre a variabilidade genética que existe na população natural e por isso a germinação *in vitro* e a conservação *in vitro* podem estar estreitamente relacionadas permitindo a manutenção da diversidade genética da espécie. A manutenção de várias plantas de uma mesma população em condições naturais, como nos moldes da conservação *in situ*, demanda grandes espaços físicos, o que nem sempre é possível.

Por outro lado, a multiplicação *in vitro* tem mostrado grande potencial para a produção de mudas em bromélias, quando comparada aos métodos convencionais, assegurando uma multiplicação rápida, geneticamente segura e que pode atender à grande demanda de mercado que existe para as bromeliáceas. A existência de mudas para atender ao consumo pode minimizar de forma significativa as atividades extrativistas. A propagação *in vitro* de bromélias tem sido registrada para várias espécies tais como *Billbergia distachia* (Vellozo) Mez (MENDES et al., 2007); *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith (GALVANESI et al., 2007); *A. blanchetiana* (KANASHIRO et al., 2007); *Dyckia maritima* Baker (SILVA et al., 2008); *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez (SILVEIRA et al., 2009, 2013); *Acanthostachys strobilacea* (Schult. F.) Klotzsch (SANTOS et al., 2010); *Vriesea reitzii* Leme & A. F. Costa (DAL VESCO; GUERRA, 2010); *A. blanchetiana* (CHU et al., 2010); *Aechmea fasciata* Baker (HUANG et al., 2011); *A. blanchetiana* e *Aechmea distichantha* Lem. (ROSA et al., 2013), *V. reitzii* (DAL VESCO et al., 2014); *Billbergia zebrina* Lindl. (THAYSI, 2016), a partir de diferentes tipos de explantes, combinações de reguladores vegetais e rotas morfogênicas, caracterizando protocolos distintos.

Para *A. nahoumii*, não há registros de protocolos estabelecidos *in vitro*, seja para multiplicação e/ ou conservação. Portanto, como categoria de espécie vulnerável, a produção de mudas é o caminho para atender simultaneamente o mercado, minimizando a extração predatória, e possibilitando a conservação *ex situ* sob condição *in vitro* e mesmo em campo.

Neste sentido, esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura como também os sais de MS, na germinação *in vitro* de sementes de *A. nahoumii* estabelecer um protocolo de micropropagação desta bromélia, visando, respectivamente, a produção de mudas em larga escala e a conservação *in vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Sementes de frutos maduros de *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (Figura 1 A-C) foram coletadas no início da deiscência em março de 2016, em uma população natural na Serra da Jibóia, Santa Terezinha, Bahia, nas coordenadas 12° 51' 08.19" S 39° 28' 34.32" W.

### **Biometria das sementes**

A descrição biométrica das sementes, que envolve o comprimento, largura e espessura foram realizadas em 100 sementes escolhidas ao acaso, retiradas de aproximadamente vinte e cinco indivíduos diferentes, escolhidos aleatoriamente e medidas individualmente com paquímetro digital. O peso de 1.000 sementes foi determinado utilizando balança analítica de precisão, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

A umidade foi avaliada utilizando quatro amostras de vinte e cinco sementes, a partir do método de massa fresca por aquecimento a 105 °C por 24h, de acordo com as exigências das Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### **Germinação *in vitro* das sementes**

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e água destilada (2:1) por 20 minutos, seguida de três lavagens em água destilada e autoclavada. Em seguida foram estabelecidas em placa de Petri (100 x 20 mm) contendo 15 mL de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), MS/2 e MS/3 suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sendo

o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As sementes permaneceram durante 60 dias em câmaras tipo B.O.D., sob o mesmo fotoperíodo de 12 horas, com densidade de fluxo de fótons de  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em quatro temperaturas: 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C.

A avaliação da germinação foi cumulativa e realizada diariamente, até a estabilização do processo. Os dados foram expressos em porcentagem média de sementes germinadas para cada tratamento. Considerou-se como germinadas aquelas sementes que apresentaram a protrusão da raiz primária (PEREIRA et al., 2008).

As porcentagens de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) foram calculados conforme:  $G (\%) = (N/A) \times 100$ , onde N = Número de sementes germinadas e A = número total de sementes;  $IVG = \sum (Gi/ni)$ , onde  $G_i$  = número de sementes germinadas e  $n_i$  = dia da contagem.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4 (sais de MS x temperatura) com quatro repetições, sendo cada repetição composta por 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Os dados de porcentagem de germinação e IVG foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ), sendo os dados de germinação previamente transformados em  $\text{arc sen} (\sqrt{x/100})$ . As análises foram realizadas no programa SAS Institute (2010).

As plântulas oriundas da germinação foram divididas em dois lotes. Cerca de 80 plântulas foram destinadas a conservação *in vitro* e cerca de 150 foram utilizadas como fonte de explantes para os ensaios de micropropagação.

### **Conservação *in vitro***

Plântulas com aproximadamente 2 cm de comprimento, provenientes da germinação *in vitro*, foram estabelecidas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MS/2 com  $2 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel® e suplementado com  $15 \text{ g L}^{-1}$  e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose onde permaneceram por 24 meses em condições de incubação com temperatura de  $25 \pm 2 \text{ °C}$ , intensidade luminosa de  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (sais de MS x concentração de sacarose), com 20 repetições, sendo cada

repetição constituída de uma plântula por tubo. Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta (cm), número de folhas verdes, número de folhas senescentes e número de raízes após 24 meses de incubação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). As análises foram realizadas no programa SAS Institute (2010).

### **Micropropagação por meio da indução de brotações de gemas adventícias**

Segmentos do caule com altura média de 0,5 cm, foram retirados de 150 plântulas com aproximadamente 4 cm de altura, obtidas do experimento de germinação *in vitro*. Os segmentos foram estabelecidos em placas de Petri (100 x 20 mm) contendo 20 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, suplementado com 0,5 µM de ANA (ácido 1-naftalenoacético) e 0,0, 2,2, 4,4 e 6,6 µM de BAP (6-benzilaminopurina). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à temperatura de 120 °C por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo 16 horas e densidade de fluxo de fótons 22 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

A multiplicação foi realizada em cinco subcultivos, pela subdivisão longitudinal dos rebentos sempre que possível, em intervalos de 45 dias. Para cada subcultivo, avaliou-se o número de brotações e a altura das brotações apenas no último subcultivo. Para corrigir os desvios na distribuição normal, o log (x + 10) foi aplicado para os dados obtidos das variáveis avaliadas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5 (concentração de BAP x subcultivo). Foi utilizada uma regressão exponencial para avaliar o número de brotos. Cada tratamento foi composto por 6 repetições, sendo cada repetição composta por 5 explantes/placa. As análises foram realizadas no programa SAS Institute (2010).

### **Aclimatização das plantas micropropagadas**

Cerca de 160 plantas foram enraizadas em meio de cultura MS sem regulador de crescimento. As plantas com tamanho médio aproximado de 3 cm de altura, foram transferidas para recipiente plástico de 300 mL contendo substrato comercial Vivato®

+ Vermiculita na proporção de 8:2 (v/v). Ao final de 30 dias foram contabilizados o número de plantas sobreviventes.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Morfologia e germinação de sementes *in vitro*

*Alcantarea nahoumii* cresce em afloramentos rochosos e a inflorescência é curto-paniculada, bipinada, subdescendente, com cerca de 20 a 30 centímetros de comprimento e estão inseridas em frutos do tipo cápsula (Figura 1 A-C). As sementes são pequenas com 9,6 mm de comprimento, 0,9 mm de largura e 0,6 mm de espessura, apresentam apêndice plumoso longo, amarronzado em apenas uma das extremidades, podendo ser facilmente transportada pelo vento (Figura 1D). O peso de 1000 sementes foi de 1,69 g.

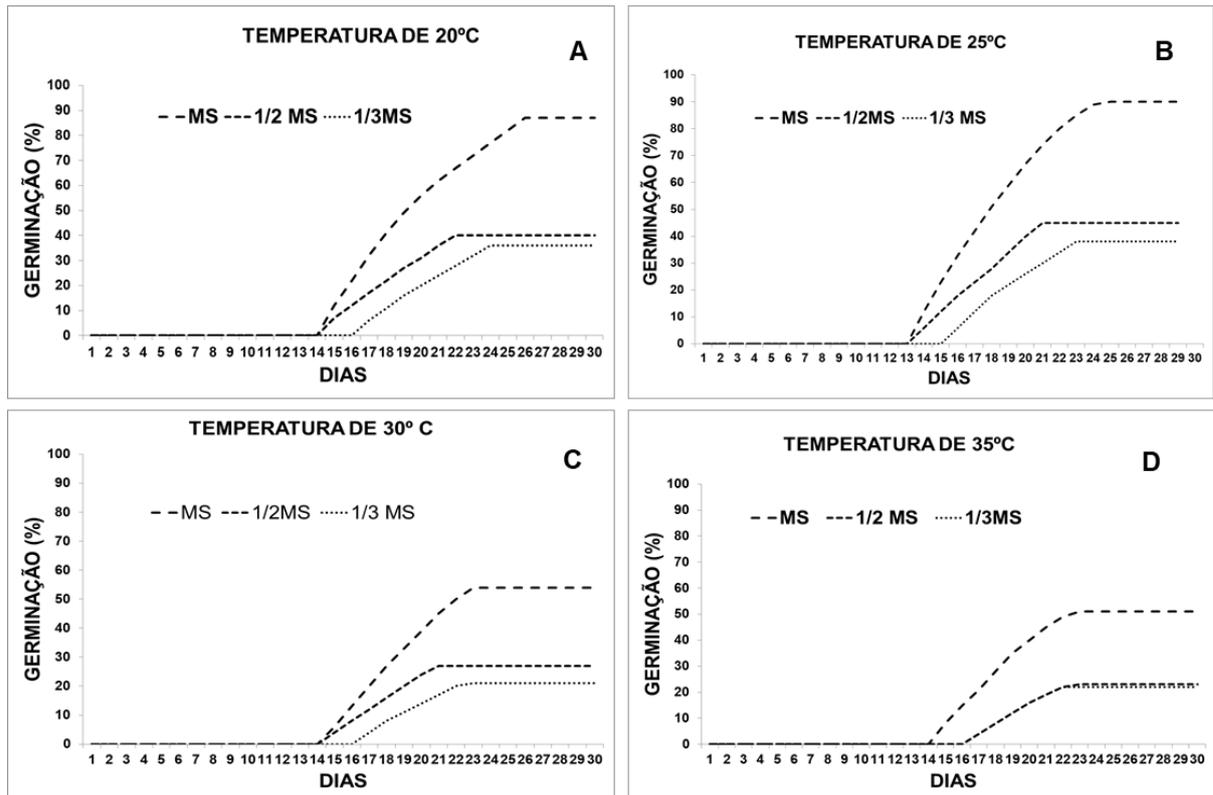
Análises biométricas de sementes são importantes, pois permitem a confecção de lotes homogêneos, o que pode garantir a qualidade fisiológica das mesmas. Sementes de maior densidade são aquelas que possuem, normalmente, maior tamanho, embriões bem formados e com maiores quantidades de reservas, sendo, portanto, potencialmente as mais vigorosas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Esse vigor pode proporcionar maior velocidade nos processos metabólicos, resultando assim na emissão mais rápida e uniforme da raiz primária no processo de germinação, maior taxa de crescimento e, conseqüentemente, produzindo plântulas com maior tamanho inicial (MUNIZZI et al., 2010).

A umidade nas sementes foi de aproximadamente 13%, mostrando-se adequado para germinação. Entretanto, esse valor está um pouco acima do que seria considerado ideal para conservação de sementes ortodoxas. Sementes pertencentes a esta categoria toleram uma dessecação de 90% a 95% da água removida, ficando com umidade entre 5% e 10%, mantendo assim sua viabilidade por um longo período de tempo (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; SILVA et al., 2012; BARROZO et al., 2014).



**Figura 1.**A-B) Plantas e inflorescência de *Alcantarea nahoumii* em condições de campo. C) Fruto maduro. D) Sementes recém retiradas do fruto. E) Sementes distribuídas em meio de cultura MS. F) Sementes germinadas aos 15 dias em meio de cultura MS. G) Plantas conservadas *in vitro* com 30% de sacarose (MS e MS/2) aos 12 meses de cultivo. H) Plantas conservadas *in vitro* com 30% de sacarose (MS e MS/2) aos 24 meses de cultivo. I) Plantas micropropagadas no quinto subcultivo com 6,6  $\mu\text{M}$  de BAP. J) Plantas micropropagadas no quinto subcultivo com 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP, evidenciando grande proliferação de brotos. K) Planta aclimatizada com 90 dias de cultivo.

Com relação à germinação a mesma ocorreu pela emissão da bainha cotiledonar com uma coifa distal. A germinação ocorreu no 15º dia, após a semeadura, estabilizando em torno de 24 dias, independente das temperaturas e dos meios testados (Figura 1 E-F e 2). Estes resultados demonstram a homogeneidade nos lotes e conseqüentemente, a boa condição fisiológica das sementes.



**Figura 2.** Porcentagem de germinação de *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae) em relação ao número de dias que as sementes germinaram sob diferentes meios de cultura (MS, MS/2, MS/3) e nas temperaturas de 20°C (A); 25°C (B); 30°C (C) e 35°C (D).

A análise de variância demonstrou uma interação significativa entre os dois fatores estudados para as duas variáveis avaliadas: germinação e velocidade de germinação (IVG) e os resultados do desdobramento dessas interações se encontram na Tabela 1.

**Tabela 1.** Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Alcantarea nahoumii* sob diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

Temperaturas (°C)	Germinação (%)		
	MS	1/2MS	1/3 MS
20	87aA	44bA	36bA
25	90aA	45bA	38bA
30	54aB	27bB	21bB
35	53aB	23bB	22 bB
CV (%)	8,37		
	Índice de Velocidade de Germinação (IVG)		
20	1,15 aB	0,60 bA	0,45 bA
25	1,59 aA	0,62 bA	0,48 bA
30	0,73 aC	0,38 bB	0,27 bB
35	0,73 aC	0,30 bB	0,29 bB
CV (%)	35,02		

Médias seguidas por letras diferentes minúsculas na linha e maiúsculas nas colunas para cada variável analisada, não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A germinação variou entre as temperaturas e os meios de cultura com as melhores porcentagens de germinação obtidas a 20 °C e 25 °C em meio de cultura MS. Por outro lado, a medida que se aumenta a temperatura e diminui a concentração de sais do MS a germinação diminui de forma significativa. Para a velocidade de germinação a temperatura de 25 °C foi a que obteve o melhor resultado, deixando evidente a forte influência da temperatura e dos meios de cultivo na dinâmica das sementes dessa espécie.

Com relação a germinação ter ocorrido em todas as temperaturas testadas, pode ser explicado pelo fato de *A. nahoumii* ser uma espécie que vegeta na região serrana (MARTINELLI et al., 2008), com grandes variações de temperatura ao longo do dia. Essas condições podem ser responsáveis pela plasticidade apresentada no teste de germinação.

Porcentagens de germinação elevadas também foram relatadas para a *Nidularium minutum* Mez (CARVALHO et al., 2013) e *Vriesea incurvata* Gaudich (PULIDO-RUEDA et al., 2018), quando cultivadas em meio de cultura MS completo,

entre 20 °C e 27 °C. Para Zeng et al. (2013), a escolha do meio de cultura, as condições fisiológicas das sementes, a maturidade das mesmas e as condições de incubação, influenciam significativamente na germinação de sementes nestas condições.

Em relação à velocidade de germinação, espécies que em condições naturais germinam no período de inverno, quando em condições de laboratório, a germinação também ocorre de forma mais rápida em baixas temperaturas. Em condições naturais ocorre uma sincronização de acordo com a estação do ano mais favorável para o crescimento das plantas jovens, melhorando, dessa forma, as chances de sobrevivência e crescimento contínuo (LARCHER, 2006). Em bromélias existem registros, que a sazonalidade das estações chuvosa e seca, influencia grandemente o padrão de floração e afeta a produção, a viabilidade das sementes e o sucesso da germinação (WRIGHT; CALDERON, 1995; BENZING, 2000).

*A. nahoumii* vegeta em ambiente serrano, com variações de temperatura entre dia e noite, mas onde não é comum temperaturas tão elevadas como as de 30 °C e 35 °C avaliadas nesse trabalho, o que pode justificar as baixas porcentagens de germinação nessas condições. Por outro lado, é preciso considerar o fato de que é uma espécie ameaçada e a capacidade de germinar, mesmo em condições adversas, ainda que com porcentagens de germinação inferiores, é altamente relevante para sua sobrevivência.

### **Conservação *in vitro***

A análise de variância, evidenciou uma interação significativa entre os fatores estudados, para duas das variáveis analisadas, altura da planta e número de folhas. O número de raízes, nem o número de folhas senescentes foram influenciados pelos tratamentos. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

As plântulas, de uma forma geral, apresentaram um desenvolvimento morfológico normal, não sendo verificado a emissão de brotações laterais ao final de 24 meses (Figura 1G-H).

Considerando os tratamentos avaliados, o meio de cultura com a concentração completa de sais do MS adicionado de 30 g de sacarose, promoveu o maior crescimento da parte aérea e apresentou o maior número de folhas, ou seja, foi o tratamento onde as plantas se desenvolveram mais. Por outro lado, o tratamento onde

houve uma redução mais significativa desse crescimento foi com a metade dos sais de MS e 15 g de sacarose, sugerindo uma redução do metabolismo das plantas nestas condições, que é o que se busca na conservação *in vitro*. Entretanto, é importante diferenciar essa desaceleração do metabolismo, com efeitos, muitas vezes tóxicos e que são confundidos com a redução do metabolismo, ainda que não tenha sido isso o ocorrido nesse ensaio.

É importante se avaliar o conjunto de variáveis antes de se decidir pelo melhor tratamento, e não apenas com base no tamanho das plantas. Uma das variáveis mais determinantes na conservação *in vitro* é o número de folhas senescentes, um importante indicador de um estágio fisiológico mais avançado.

No caso deste trabalho, não houve diferenças significativas para a variável número de folhas senescentes, o que deixa evidente, que apesar do maior crescimento observado no tratamento com a concentração de sais completa do MS e 30 g de sacarose, não houve comprometimento ou envelhecimento da planta conservada. Em vista disso, esse tratamento deve ser considerado melhor para a conservação *in vitro* dessa espécie de bromélia, já que essas plantas têm mais possibilidades de terem melhor desempenho na aclimatização, principalmente pelo elevado número de folhas.

Quanto a variável número de raízes, a mesmas não variou entre os tratamentos com valores entre dois (MS + 15 g de sacarose) a três (MS + 30 g de sacarose). As raízes *in vitro* nem sempre são funcionais quando entram na condição *ex vitro*, demandando, algumas vezes um tratamento de corte para que possam ser renovadas no período de aclimatização (SOUZA et al., 2013). A etapa de aclimatização é delicada e demanda muitos cuidados, já que é um processo gradual de adaptação da planta a uma condição ambiental diferente.

Em outras espécies de bromélias, a redução da concentração da sacarose e dos sais do meio de cultura MS tem sido um artifício para conservação *in vitro* considerando um período entre 12 a 24 meses, como a *V. reitzii* (RECH FILHO et al., 2005), *Vriesea gigantea* Gaudich. e *V. philippocoburgii* Wawra (DROSTE et al., 2005), *A. fasciata* e *A. miniata* Baker (COSTA et al., 2012). Esta estratégia além de eficiente também reduz os custos da manutenção da cultura *in vitro*. Esses resultados, diferentes dos que foram encontrados para *A. nahoumii* deixam evidente a necessidade de estudos específicos e de uma avaliação criteriosa dos resultados

obtidos a fim de se decidir o que deve ser adotado para a espécie em foco. E finalmente, e não menos relevante, as plantas conservadas, como vieram de sementes oriundas de frutos coletados aleatoriamente na população, possuem uma boa representatividade da diversidade genética dessa população.

**Tabela 2.** Altura da planta (cm) e número de folhas verdes de plantas da *Alcantarea nahoumii* conservadas *in vitro* durante 24 meses em função das concentrações de sais de MS e sacarose.

Sacarose	MS	
	Altura da planta (cm)	
15g	5,61 Ab	5,11 bB
30g	8,87 aA	7,22 bA
CV (%)	5,44	
Número de folhas		
15g	1,70 bB	2,40 aA
30g	3,20 Aa	2,50 bA
CV (%)	25,99	

Médias seguidas por letras diferentes minúscula na linha e maiúsculas nas colunas para cada variável analisada, não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

### Micropropagação

Parte das plântulas de *A. nahoumii* obtidas no ensaio de germinação foram usadas como explante de partida para os experimentos de micropropagação. A propagação a partir de sementes permite a manutenção da variabilidade genética da população, o que é relevante para programas de conservação *in situ*, por meio da reintrodução em ambiente natural (PINTO et al., 2010), assim como para a conservação *ex situ*. Esse princípio, de usar plântulas oriundas de sementes de uma população natural deve ser mantido quando se pretende produzir mudas em larga escala para essas bromélias. As diferenças que podem ser observadas, nesse caso, entre plantas, não são limitantes para o uso dessas plantas pelo mercado.

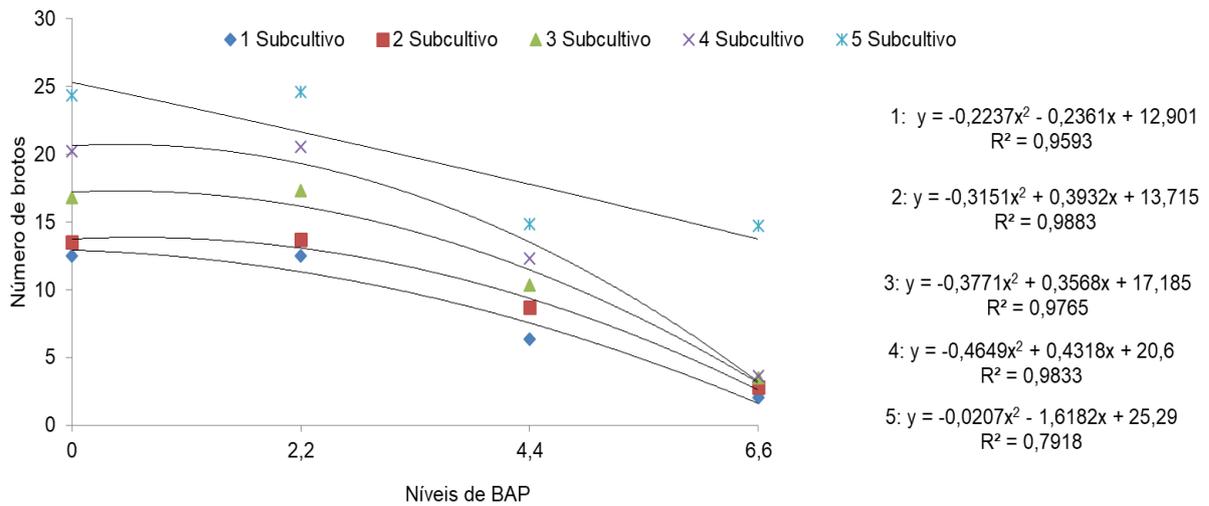
Outra vantagem de se usar sementes para estabelecimento de plantas *in vitro* decorre da maior facilidade na desinfestação de sementes quando comparadas com tecidos extraídos de plantas nativas (BELLINTANI et al., 2007).

Foi registrada a multiplicação dos brotos em todos os tratamentos avaliados. Entretanto as maiores taxas observadas foram para os tratamentos sem regulador vegetal ou com a concentração de 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP associado a 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA (Figura 1 I-J e 3). Resultados semelhantes usando essas concentrações, foram obtidos na multiplicação de *Cryptanthus sinuosus* L. B. Sm.(ARRABAL et al., 2002), *A. blanchetiana* e *A. distichantha* (ROSA et al., 2013) e *Aechmea setigera* Mart. ex Schult.f. (VASCONCELOS et al., 2015).

As citocininas, dentre outras atuações, agem estimulando a formação de brotos, principalmente quando associadas à uma auxina. Porém a natureza e a concentração desses reguladores irão variar de acordo com a espécie (GANA, 2010). As citocininas apresentam receptores celulares que conforme Sakakibara (2006) podem variar entre as espécies vegetais e que conferem especificidades na interação citocinina-receptor, onde o processo de reconhecimento molecular das citocininas envolve modificações das cadeias laterais ligadas à adenina.

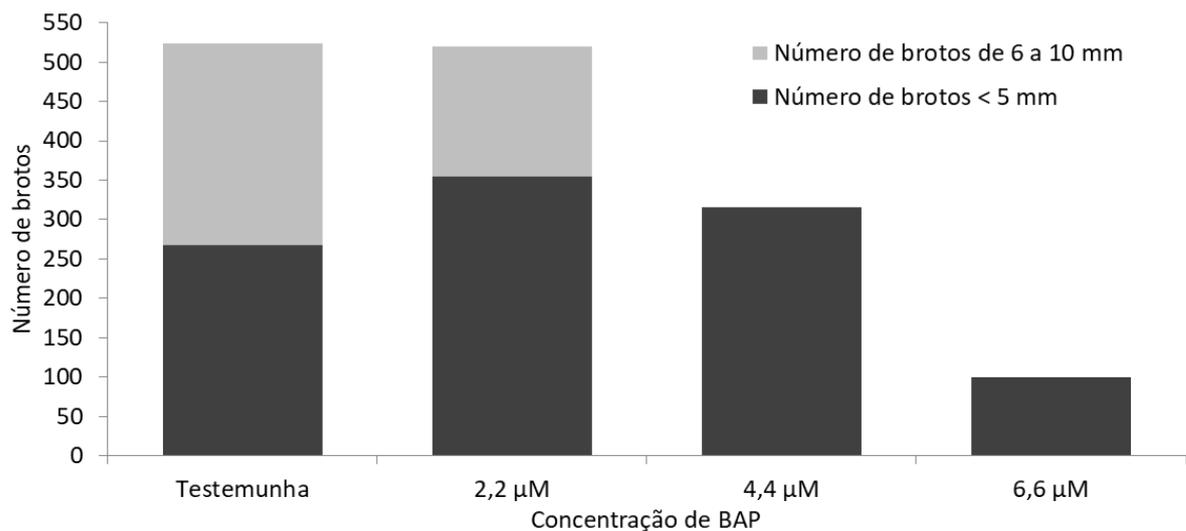
Para *A. nahoumii*, o tratamento citocinina- BAP, produziu o maior número de brotos ao longo dos subcultivos, o que sugere a presença endógena de um regulador que tenha favorecido esse comportamento e o efeito inibitório que foi observado, à medida que se aumentou a concentração de BAP (Figura 3). Esse efeito inibitório pode ser confirmado na Figura 4 onde são apresentados os dados referentes ao número de brotações por explantes obtidos em cada concentração de BAP. As brotações maiores são registradas apenas no tratamento citocinina- BAP e onde se usou 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP. Os tratamentos com as maiores concentrações de BAP só geraram brotos menores que 0,5 mm.

Em relação ao efeito dos subcultivos sobre o número de brotos foi possível constatar que à medida que o material vegetal foi transferido para um novo meio, houve um incremento em valores absolutos no número de brotações adventícias, no decorrer do tempo (Figura 3).



**Figura 3.** Número de brotos nas diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) nos cinco subcultivos em *Alcantarea nahoumii*.

Com relação ao número de brotos por tamanho médio das brotações após 5 subcultivos, verificou-se que para o tratamento citocinina- BAP obteve-se 268 brotações com 5 mm (51%) e 256 brotações entre 6 a 10 mm (49%). Na presença de 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP 68% das brotações apresentaram tamanho médio de 5 mm e 32% entre 6 a 10 mm. Quando as concentrações de BAP foram de 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP e 6,6  $\mu\text{M}$  100% dos brotos tiveram tamanho médio de 5 mm.



**Figura 4.** Número total de brotos classificados por tamanho nas diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) no final do quinto subcultivo em *Alcantarea nahoumii*.

Resultados semelhantes foram encontrados na micropropagação de *Melissa officinalis* L. (REIS et al., 2008), *Splanum betaceum* Cav. (COPATTI et al., 2016), *Plathymenia reticulata* Benth. (MOURA et al., 2012) e *Hancornia speciosa* Gomes (OLIVEIRA et al., 2016), onde em meio de cultura MS citocinina- BAP, os explantes mostraram-se mais responsivos.

De acordo com Mallón et al. (2011), este comportamento pode ser atribuído à presença de concentrações endógenas de auxinas e citocininas suficientes para induzir seu desenvolvimento *in vitro*. Resultados semelhantes ao nosso com o efeito inibitório do BAP, quando usado na concentração mais alta foi verificado com *A. blanchetiana* e *A. distichantha* (ROSA et al., 2013), que alcançaram maiores porcentagens de brotações quando usaram baixas concentrações de BAP.

As plantas jovens regeneradas da *A. nahoumii* foram aclimatizadas e após 90 dias o percentual de sobrevivência foi de 88%. O elevado percentual de sobrevivência na aclimatização demonstra a viabilidade da micropropagação dessa espécie e a possibilidade de se produzir mudas para atender ao mercado, assim como para produzir plantas para uso na conservação da espécie (Figura 1K).

## CONCLUSÕES

As sementes da *A. nahoumii* apresentam restrições para a germinação nas temperaturas mais elevadas de 30 °C e 35 °C;

Temperaturas de 20 °C e 25 °C em combinação com o meio MS são mais eficientes no processo de germinação das sementes de *A. nahoumii*;

Plantas da *A. nahoumii* podem ser conservadas *in vitro* sob condição de crescimento lento por 24 meses quando mantidas em meio de cultura MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose;

O meio de cultura MS na ausência de regulador vegetal ou quando suplementado com 2,2 µM de BAP associado a 0,5 µM de ANA proporcionam as maiores taxas de multiplicação da *A. nahoumii*;

A aclimatização das plantas apresenta elevada taxa de sobrevivência.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. C. S.; CUNHA, R.; SOUZA, A. F.; REIS, R. B.; ALMEIDA, K. J. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed Science & Technology**, n. 3, p. 125-137, 2003.
- ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 11, n. 6, p. 1081-1089, 2002.
- BARROZO, L. M.; ALVES, E. U.; ARAUJO, L. R.; SENA, D. V. A.; MEDEIROS, D. S.; SANTOS, J. C. Qualidade fisiológica de sementes de ingá em função da secagem. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 645-654, 2014.
- BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthopytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1101-1103, 2007.
- BENZING, D. H. Bromeliaceae: Profile and adaptive radiation. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2000. 690 p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ ACS, 2009. 399 p.
- CARVALHO, C. P.; HAYASHI, A. H.; BRAGA, M. R.; NIEVOL, C. C. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. **Plant Physiology Biochechnology**, n. 71, p. 144-154, 2013.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal:FUNEP, 2000, 588 p.

CHU, E. P.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S.; GIAMPAOLI, P.; YOKOTA, E. S. *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 451-455, 2010.

COELHO, M. F. B.; VIEIRA, S. N.; CHIG, L. A.; SANTOS, L. W.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Superação da dormência em sementes de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 472-476, 2011

COPATTI, A.; LOY, F.; CRUZ, J. G.; SCHWARTZ, C. D.; MELLO-FARIAS, P. Reguladores vegetais na propagação *in vitro* de Tamarileiro (*Solanum betaceum*). **Revista Congrega Urcamp**, v. 13A, p. 822-831, 2016.

COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, M. J. S.; SOUZA, F. V. D.; ROCHA, M. A. C. Conservação *in vitro* de *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker e *Aechmea miniata* Beer ex Baker (Bromeliaceae-Bromelioideae). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 4, p. 293-303, 2012.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 4, p. 748-755, 2010.

DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; PRADO, J. P.C.; WELTER, L. J.; GUERRA, M. P. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. **Acta Scientiarum – Biological Science**, v. 36, n. 3, p. 271-278, 2014.

DROSTE, A.; SILVA MACHADO, A.; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable Bromeliads native to southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. 2004, 323 p.

FORZZA, R. C.; COSTA, A. F.; LEME, E. M. C.; VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L.; LOUZADA, R. B.; MONTEIRO, R. F.; JUDICE, D. M.; FERNANDEZ, E. P.; BORGES, R. A. X.; PENEDO, T. S. A.; MONTEIRO, N. P.; MORAES, M. A. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson & Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pp. 315-397, 2013.

GALVANESI, M. S.; TAVARES, A. R.; AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; CHU, E. P.; STANCATO, G. C.; HARDER, I. C. F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, n, 54, p. 63-67, 2007.

GANNA, A. S. The role of synthetic growth hormones in crop multiplication and improvement. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 51, p. 10330-10334, 2010.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D., GOUDA, K. **Encyclopaedia of Bromeliads Version 4**. Disponível em: <<http://bromeliad.nl/encyclopedia/>>. Acesso em: 1 Julho 2018.

HUANG, P. L.; LIAO, L. J.; TSAI, C. C.; LIU, Z. H. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.105, n. 1, p. 73-78, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS. 2015. Disponível em: <<http://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica>>. Acesso em: 1 março 2018.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇÁLVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. Cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, v.34, p. 59-66, 2007.

KERSTEN, R. A. Epífitas vasculares: histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. **Hoehnea**, v. 37, p. 9-38, 2010.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Rima, São Carlos, SP, 2006. 398 p.

MALLÓN, R.; RODRÍGUEZ-OUBINA, J.; GONZÁLEZ, M. L. Shoot regeneration from *in vitro* - derived leaf and root explants of *Centaurea ulreia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 523-530, 2011.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M. P. L.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 209-258. 2008.

MELO M. F. F.; VARELA, V. P. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, germinação e plântulas de duas espécies florestais da Amazônia: I. *Dinizia excelsa* Ducke (Angelim-Pedra). II *Cedrelinga catenaeformis* Ducke (Cedrorana) - Leguminosae: Mimosoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 54-62, 2006.

MENDES, G. C.; SOARES, C. Q. G.; BRAGA, V. F.; PINTO, L. C.; SANTANA, R.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 972-974, 2007.

MOURA, L. C.; TITON, M.; MIRANDA, N. A.; MOREIRA, T. P.; OLIVEIRA, M. L. R. Multiplicação e alongamento *in vitro* de vinhático (*Plathymenia reticulata*). **Scientia Forestalis**, v. 40, n. 96, p. 499 - 505, 2012.

MUNIZZI, A.; BRACCINI, A. L.; RANGEL, M. A. S.; SCAPIM, C. A.; ALBRECHT, L. P. Qualidade de sementes de quatro cultivares de soja, colhidas em dois locais no estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.176-185, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. M. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. M.; ALOUFA, M. A. I. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Floresta**, v. 46, n. 3, p. 335-342, 2016.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de bromélias**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2004. 116p.

PEREIRA, A. R.; PERERIRA, T. S.; ANDRADE, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós- seminal de espécies de Bromeliaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1150- 1162, 2008.

PINTO, J.R.S.; FREITAS, R.M.O.; PRAXEDES, S. C. Stimulation of *in vitro* development of *Cattleya granulosa* by sucrose. **General and applied Plant Physiology**, v. 36, n. 3/4, p. 183-188, 2010.

PULIDO-RUEDA, E. E.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A.; NEGRELLE, R. *In vitro* germination and growth of *Vriesea incurvata* Gaudich. **Acta Agronomica**, v. 67, n.1, p 140-145, 2018.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v.14, p.1799- 1808, 2005.

REIS, E, S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008.

ROSA S. S.; SOUZA, F. V. D.; VIDAL, A. M.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 112-118. 2013.

ROSA, L. S.; FELIPPI, M.; NOGUEIRA, A. C.; GROSSI, F. Avaliação da germinação sob diferentes potenciais osmóticos e caracterização morfológica da semente e plântula de *Ateleia glazioviana* Baill (Timbó). **Cerne**, n. 11, n. 3, p 306-314. 2005.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p.431-449, 2006.

SANTOS D.S; TAMAKI V; NIEVOLA C.C. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. F.) Klotzsch via nodal segments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. p.46: 524-229.2010.

SAS INSTITUTE INC. SAS/ STAT user´s guide: statistics. Version 9.1.3. ed. Cary, NC, 2010.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. E.; COAN, A. I. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from the "Campos Gerais", Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 945- 951. 2006.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; GESING, J. P. A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Heringia**,v. 63, n. 1, p. 135-138, 2008.

SILVA, M. V. V.; SALES, J. F.; SILVA, F. G.; NETO, A. R.; ALBERTO, P. S.; PEREIRA, F. D. The influence of moisture on the *in vitro* embryo germination and morphogenesis of babassu (*Orbignya phalerata* Mart. Acta Scientiarum. Agronomy **Maringá**, v. 34, n. 4, p. 453-458, 2012.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. 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, 2009.

SILVEIRA, D.G.; LINO, L.S. M.; SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D. Somatic embryogenesis of *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez, an important source of fiber from native Brazilian bromeliads. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 547-555. 2013.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A.; MENEZES, M. C.; SILVEIRA, D. G., SANTOS, V. S. Micropropagação da mandioca. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa , p. 345-371, 2013.

THAYSI, V. S.; THIESEN, J. F.; GUERRA, M. P.; SANTOS, M. Morpho- and histodifferentiation of shoot regeneration of *Billbergia zebrina* (Helbert) Lindley nodular cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 2, p. 393–403, 2016.

VASCONCELOS, J. M.; LEÃO, J. R. A.; RAPOSO, A.; FERMINO JUNIOR, P. C. P. Sistemas de cultivo *in vitro* e aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 4, p. 240-246, 2015.

VERSIEUX, L. M.; ELBL, P. M.; WANDERLEY, M. G. L.; MENEZES, N. L. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. **Nordic Journal of Botany**, v. 28, p. 385-397, 2010.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. Flora da Bahia: Bromeliaceae-*Alcantarea*. **Sitientibus**, v. 10, p. 147-151, 2010.

WRIGHT, S. J.; CALDERON, O. Phylogenetic patterns among tropical flowering phenologies. **Journal of Ecology**. v. 83 .p. 939-948. 1995.

ZENG, S.; ZHANG, Y.; SILVA, J. A. T.; WU, K. L.; ZHANG, J.; DUAN, J. Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cyrtopodium*. **Critical Reviews in Biotechnology**, n. 34, p. 358-371. 2013.

## CAPÍTULO 2

### DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL E CRIOPRESERVAÇÃO DE BROMÉLIAS ENDÊMICAS E EM RISCO DE EXTINÇÃO<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup>Artigo a ser submetido no periódico Scientia Horticulturae.

## DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL E CRIOPRESERVAÇÃO DE BROMÉLIAS ENDÊMICAS E EM RISCO DE EXTINÇÃO

Autora: Simone Sacramento dos Santos Silva

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**RESUMO:** As bromélias *Vriesea bahiana*, *Hohenbergia castellanosi* e *Encholirium spectabile*, são espécies endêmicas do Brasil e em condições de vulnerabilidade. A busca por estratégias de conservação para essas espécies é relevante a fim de evitar uma erosão genética irreversível. A criopreservação é uma estratégia de conservação a longo prazo, em que o material biológico é submetido a temperaturas extremamente baixas (-196°C). O armazenamento de sementes utilizando esse método, requer principalmente a determinação da umidade das sementes bem como sua tolerância à dessecação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da criopreservação de sementes de três espécies endêmicas do Brasil e ameaçadas de extinção, selecionadas segundo critérios de vulnerabilidade, assim como proceder ao estudo de desenvolvimento pós-seminal das mesmas. Para o ensaio de germinação das sementes foram utilizados três tratamentos como substratos: papel Germitest®, substrato comercial Vivato® e areia lavada. Para o ensaio de criopreservação e viabilidade das sementes, foram testados cinco intervalos de tempo de dessecação (2, 4, 6, 12 e 24 horas). A observação do desenvolvimento pós-seminal foi feita diariamente e as diferentes fases foram coletadas com o auxílio de estereomicroscópio e fixadas para microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. A análise dos resultados ao comparar os três substratos utilizados, demonstrou que o papel Germitest® apresentou IVG superior aos demais, enquanto a areia lavada apresentou os menores índices de velocidade de germinação para as três espécies estudadas. O maior tempo de germinação foi observado em *V. bahiana* com o substrato Vivato® e nas outras duas espécies em areia lavada. Para os ensaios de criopreservação e viabilidade das sementes, os resultados demonstraram que a dessecação não afetou significativamente a germinabilidade das sementes de *V. bahiana*, entretanto *E. spectabile* e *H. castellanosi*, não foram favorecidas com a dessecação uma vez que, a taxa de germinação diminuiu a medida que se aumentou os tempos de dessecação. Contudo, a *V. bahiana* quando submetida ao nitrogênio líquido apresentou germinação de quase 100%, evidenciando uma quebra de dormência para essa espécie. Dessa forma, sementes de *Vriesea bahiana* podem ser criopreservadas com 5,9% de umidade quando dessecadas por 24 horas, enquanto que as sementes de *Hohenbergia castellanosi* e *Encholirium spectabile*, podem ser criopreservadas com 2,2 e 7,2% respectivamente de umidade quando dessecadas por 2 horas. Os caracteres morfológicos mais relevantes para a diferenciação entre gêneros e subfamílias de Bromeliaceae referem-se à forma e ao tipo de apêndices das sementes. Neste estudo, as três espécies avaliadas apresentaram forma e tamanho em suas estruturas bastantes diferenciadas. Levando em conta a dessecação e o armazenamento em baixas temperaturas os estudos para essas sementes podem classificar as mesmas como ortodoxas.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae; Dessecação de sementes, Conservação de germoplasma; Ornamentais.

## POST-SEMINAL DEVELOPMENT AND CRIOPRESERVATION OF ENDEMIC BROMELLES AND AT EXTINCTION RISK

**ABSTRACT:** The bromeliads *Vriesea bahiana* Leme, *Hohenbergia castellanosii* L.B.Sm. & Read and *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. are endemic species to Brazil and are endangered, due largely to predatory extraction. The conservation of these species is essential to assure biodiversity. Cryopreservation is a method of long-term *in vitro* conservation, in which the biological material is submitted to extremely low temperatures. The storage of seeds using this method mainly requires determining the seeds' moisture content and their tolerance to desiccation. The objective of this work was to evaluate the effect of cryopreservation of seeds of these three endangered species endemic to Brazil, selected according to vulnerability criteria, as well as to study their post-seminal development. For the germination tests, three treatments were used, consisting of different substrates: Germitest<sup>®</sup> paper, Vivato<sup>®</sup> commercial substrate, and washed sand. For the tests of seed cryopreservation and viability, five desiccation time intervals were used (2, 4, 6, 12 and 24 hours). The post-seminal development was observed daily and samples of the different phases were collected with the help of a stereoscopic microscope and fixed for observation by scanning electron and light microscopy. The results showed that of the three substrates, the Germitest<sup>®</sup> paper presented the best PGI, while the washed sand presented the lowest germination speed and the Vivato substrate presented the highest germination rate. In the seed cryopreservation and viability assays, the desiccation did not significantly affect the germinability of the *V. bahiana* seeds, while desiccation of *E. spectabile* and *H. castelanossi* reduced the germination rate during the time intervals studied. In turn, *V. bahiana* seeds cryopreserved in liquid nitrogen had the highest germination rate of all the species, demonstrating breakage of dormancy. Therefore, it can be inferred that seeds of *Vriesea bahiana* Leme can be cryopreserved with 5.9% moisture when desiccated for 24 hours, while the seeds of *Hohenbergia castellanosii* L.B.Sm. & Read and *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. can be cryopreserved with moisture contents of 2.2 and 7.2 % respectively when desiccated for 2 hours. The most relevant morphological traits for differentiation among genera and subfamilies of Bromeliaceae are the shape and type of appendages of the seeds. The three species evaluated were easily distinguished by the shape and size of their structures. Taking into account the desiccation and storage at low temperatures, these seeds can be classified as orthodox and *ex situ* conserved.

**Keywords:** Bromeliaceae; Seed desiccation, Germplasm conservation; Ornamental.

## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae Juss. envolve um grande número de espécies, sendo considerada uma das mais diversificadas e com maiores taxas de endemismo no Brasil, com 75 gêneros e 3.578 espécies (GOUDA et al., 2018). Dessas 1.067 são endêmicas do território brasileiro (FORZZA et al., 2012). Apesar de possuir distribuição em todos os ecossistemas, sua maior diversidade está no bioma Mata Atlântica (FORZZA et al., 2012; 2013).

Algumas dessas espécies, crescem em condições ambientais específicas e restritas e sobrevivem como populações pequenas e isoladas (BENZING, 2000). Além disso, muitas bromélias são consideradas ameaçadas devido à fragmentação severa, à destruição do habitat, às práticas florestais e à super exploração destas plantas como ornamentais (JORGENSEN, 2004; PEREIRA et al., 2008).

Apesar da importância ecológica da família Bromeliaceae e considerando sua grande diversidade, há pouco conhecimento sobre suas estruturas de propagação e o comportamento de germinação de sementes em termos de fatores ambientais. Estudos relacionados às estruturas morfológicas das sementes são de grande importância para se diferenciar grupos taxonômicos, assim como contribuem para subsidiar um armazenamento adequado e entender melhor os processos de germinação (MOURA et al., 2010; PÊGO et al., 2011).

O desenvolvimento pós-seminal é importante na diferenciação de espécies de plantas e compreensão do estabelecimento dinâmico de populações naturais, uma vez que, a emergência das sementes é um estágio crítico no seu ciclo de vida (FONTENELLE et al., 2007; SILVA; MÔRO, 2008). Entretanto, apesar dessa relevância, poucos relatos abordam a biometria e a morfologia de sementes.

Por outro lado, as sementes podem se constituir em estruturas ideais para armazenar um pool gênico de uma determinada espécie, garantindo a conservação de uma variabilidade genética relevante (GOSLING, 2003). Assim, o estudo dos melhores métodos de armazenamento de sementes é uma forma de contribuir para a

preservação das espécies e, em alguns casos, de resgatá-la de uma situação de vulnerabilidade e ameaça.

Apesar da existência de vários métodos de conservação *ex situ* os bancos de sementes são os mais eficientes para uma gama de espécies, principalmente, por sua fácil aplicação e uma grande quantidade de espécies que podem ser conservadas em um espaço reduzido (GOSLING, 2003). Na verdade, essa é a forma de conservação mais utilizada no mundo, representando quase 90% de todas as coleções (FAO, 1996). Apesar de muitas outras estruturas, como plantas e vários tipos de tecidos serem conservados em bancos genéticos, as sementes seguem sendo o maior repositório de genes para a humanidade. A criação do Svalbard Global Seed Vault (SGSV) em 2008 é o maior exemplo disso, além de se constituir no maior banco de sementes do mundo como resultado de vários acordos internacionais (DULLOO et al., 2010).

Nas últimas décadas, os avanços com a técnica da criopreservação têm avançado e abrem espaço à possibilidade de uma conservação a longo prazo de valiosos recursos genético de diversas espécies (VORONKOVA et al., 2010; FERRARI et al., 2016).

A criopreservação vem sendo usada para a conservação de vários tipos de tecidos que podem ir desde ápices meristemáticos, grãos de pólen, sementes, entre outros (BENSON, 2008). Essa técnica se constitui, basicamente na manutenção dos tecidos vegetais mantidos em nitrogênio líquido a uma temperatura ultra baixa (-196 °C). Como o metabolismo é bastante reduzido nesta temperatura, o processo de deterioração é quase nulo, assim, como o risco de perda por enfermidades ou variações genéticas (WALTERS et al., 2004).

No entanto, estudos adicionais são necessários para determinar as condições ideais de armazenamento criogênico, tais como: taxas de resfriamento e descongelamento, propriedades físicas e químicas e o mais importante, a quantidade de água da semente (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2003).

A quantidade de água das sementes é um fator importante na conservação/criopreservação, pois, em quantidade inadequada pode ocasionar reações de deterioração, ataque de insetos, além de formação de cristais de gelo e consequente ruptura das membranas celulares no caso da criopreservação, ocasionando inclusive, a morte celular (ENGELMANN, 1997). Desta forma, faz-se necessário a retirada dessa

água por meio de procedimentos de dessecação ou utilizar substâncias crioprotetoras para reduzir esses danos celulares.

Em bromélias endêmicas e ainda ameaçadas por ações antrópicas, a demanda por estratégias de conservação eficientes é relevante e deve ser considerada. A criopreservação de sementes, oriundas de populações naturais dessas espécies, pode ser uma alternativa valiosa, mesmo que seja como duplicata de segurança.

Partindo desse pressuposto, esse trabalho teve por objetivo, avaliar o desenvolvimento pós-seminal e a criopreservação de três espécies de bromélias endêmicas, ameaçadas de extinção e das três diferentes subfamílias, a fim de se obter um protocolo que possa garantir e resguardar a variabilidade genética dessas espécies.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Sementes de *Vriesea bahiana* Leme, foram coletadas na Serra da Jibóia, município de Santa Terezinha, Bahia, em março de 2017, nas coordenadas 12° 51' 08.19" S 39° 28' 34.32" W.

*Hohenbergia castellanosii* L.B.Sm. & Read tiveram suas sementes coletadas no município de Nilo Peçanha, Bahia, nas coordenadas 13° 42' 21.708" S e 39° 0' 46.256" W, em abril de 2017 e sementes de *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. foram coletadas no município de Milagres, Bahia, nas coordenadas 12° 52' 18.199" S e 39° 51' 16.783" W, no mesmo mês.

Para obter amostras de sementes representativas das populações, 40 frutos maduros de cada espécie (mudança na coloração dos frutos) e de diferentes plantas foram coletados de forma aleatória nas três diferentes populações.

### **Ensaio de germinação de sementes**

As sementes foram removidas dos frutos manualmente e o apêndice (*V. bahiana*) e mucilagem (*H. castellanosii* e *E. spectabile*) envolvendo as sementes foram removidos com auxílio de pinça e papel toalha para evitar a proliferação de microrganismos. Foram mensurados os valores de comprimento, largura e espessura das sementes, por meio de um paquímetro digital em 150 sementes de forma aleatória, conforme metodologia descrita por Pereira et al. (2008). O peso de 1.000

sementes foi determinado utilizando balança analítica de precisão, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de germinação, foi realizada a assepsia prévia das sementes, que foram imersas em álcool 70% por um minuto e em seguida enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada. As sementes foram colocadas para germinar em caixas plásticas Gerbox<sup>®</sup>, em temperatura de  $27 \pm 2$  °C, intensidade luminosa de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. As avaliações foram realizadas diariamente até o 40º dia.

Foram utilizados três tratamentos como substratos para germinação: papel Germitest<sup>®</sup>, substrato comercial Vivato<sup>®</sup> e areia lavada. Todos foram autoclavados previamente a uma temperatura de 120 °C por 20 minutos. As sementes foram distribuídas em papel Germitest<sup>®</sup>, umedecido com água autoclavada, utilizando uma quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Para o substrato comercial Vivato<sup>®</sup> e a areia lavada foram pesados 500 g de cada substrato que foram umedecidos com 200 mL de água autoclavada.

A emergência da raiz primária (1 mm) foi o critério usado para se considerar o início da germinação (PEREIRA et al., 2008). As porcentagens de germinação, Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e o Tempo Médio de Germinação (TMG) foram calculados conforme:  $G(\%) = (N/A) \times 100$ , onde N = Número de sementes germinadas e A = número total de sementes;  $IVG = \sum (Gi/ni)$ , onde Gi = número de sementes germinadas e ni = dia da contagem;  $TMG = (\sum Gi/ni) / \sum Gi$ .

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 (espécies x substratos) com quatro repetições, sendo cada repetição composta por 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Os dados biométricos, porcentagem de germinação e IVG foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ), sendo os dados de germinação previamente transformados em  $\text{arc sen}(\sqrt{x/100})$ . As análises foram realizadas no programa SAS Institute (2010).

### **Umidade das sementes**

A umidade das sementes foi avaliada utilizando quatro amostras de vinte e cinco sementes de cada espécie, a partir do método de massa fresca por aquecimento

a 105 ° C por 24 h, de acordo com as exigências das Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### **Desenvolvimento pós-seminal**

Para o desenvolvimento pós-seminal, 100 sementes de cada espécie foram distribuídas sobre duas folhas de papel Germitest® conforme metodologia descrita acima.

A observação do desenvolvimento pós-seminal foi feita diariamente e as diferentes fases foram coletadas com o auxílio de estereomicroscópio e fixadas para microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. Os critérios utilizados para caracterizar a plântula normal seguiram a recomendação de Pereira et al. (2008) e Silva e Scatena (2011): desenvolvimento radicular com expansão total da primeira folha e aparecimento da segunda folha. Para planta jovem, foi considerado a expansão total da segunda e o aparecimento da terceira folha.

Nas diferentes fases do desenvolvimento pós-seminal, as plântulas foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl<sub>2</sub> (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas e na sequência processadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz (ML).

Para as análises morfológicas pela microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram desidratadas em série etílicas crescentes (35-100%) e em seguida secas ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido e montadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-IT300 LV (Tokyo Japan) a 20 kV do NAP-MEPA -ESALQ/USP sendo as imagens digitalizadas.

Para a caracterização anatômica, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (35-100%), infiltrada e emblocadas utilizando-se o kit Histo-resina (hidroxietilmetacrilato, Leica Heidelberg). A polimerização da resina foi feita à temperatura ambiente por 48 horas. Cortes histológicos seriados (4-5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo Leitz, modelo 1516, dispostos em lâminas histológicas e corados com fucsina ácida (0,1% p/v), seguido de azul de toluidina (0,05% p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em microscópio de fluorescência B x S1 (Olympus Latin America Inc).

### **Criopreservação das sementes**

Para os ensaios de criopreservação e viabilidade das sementes foram testados cinco intervalos de tempo de dessecação (2, 4, 6, 12 e 24 horas). As sementes foram distribuídas em três lotes de criotubos de 2 mL e colocadas em um dessecador contendo sílica gel ativa. Um lote foi utilizado para determinar a umidade nos diferentes intervalos de tempo com pesagens em balança analítica. O segundo lote foi utilizado como controle (NL-) e o terceiro para a criopreservação (NL+). Os controles se constituíram nas sementes retiradas do dessecador e alocadas diretamente em caixa Gerbox® sobre papel Germitest®, nas mesmas condições de incubação do ensaio de germinação.

Para a criopreservação, as sementes foram retiradas do dessecador e inseridas imediatamente em nitrogênio líquido (-196 °C) onde permaneceram por 24 horas. O descongelamento foi realizado em temperatura ambiente por 30 min e as sementes foram colocadas para germinar nas mesmas condições já descritas.

As avaliações foram feitas diariamente e a emergência da raiz primária (1 mm) foi também o critério usado para se considerar a germinação. As porcentagens de germinação foram realizadas conforme descrito anteriormente.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 (espécies x tempos de dessecação). Para cada tratamento foram usadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ), sendo os dados de germinação previamente transformados em  $\text{arc sen}(\sqrt{x/100})$ . As análises foram realizadas no programa SAS Institute (2010).

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A análise de variância, demonstrou que as espécies se comportaram de forma diferente entre si, sem, no entanto, terem interagido de forma significativa com os substratos para a porcentagem de germinação. Para o índice de velocidade de germinação e o tempo médio de germinação houve uma interação significativa entre os dois fatores.

As maiores porcentagens de germinação ocorreram na *H. castellanosii* com uma variação de 73% no papel Germitest® a 82% na areia lavada (Tabela 1). Para *V.*

*bahiana* as porcentagens de germinação variaram de 39% em areia lavada a 49% de substrato comercial Vivato®, e em *E. spectabile* a variação ocorreu de 66% em areia lavada a 74% de substrato Vivato® (Tabela 1). De forma geral, houve pouca variação entre os substratos dentro de cada espécie o que pode estar relacionado com a grande plasticidade observada nas bromélias. Por questões de praticidade, pelo índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação e para as condições experimentais, decidiu-se pelo uso do papel Germitest® para os demais experimentos de criopreservação.

**Tabela 1.** Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação de três espécies de bromélias em diferentes substratos.

	Papel Germitest®	Substrato Vivato®	Areia lavada
	Germinação (%)		
<i>V. bahiana</i>	46 b	49 b	39 c
<i>H. castellanosii</i>	73 a	80 a	82 a
<i>E. spectabile</i>	69 a	74 a	66 b
CV (%)	7,45		
	Índice de Velocidade de Germinação (IVG)		
<i>V. bahiana</i>	4,86 cA	1,86 cB	1,69 cB
<i>H. castellanosii</i>	12,54 bA	6,25 aB	3,22 aC
<i>E. spectabile</i>	15,63 aA	5,53 bB	2,97 bC
CV (%)	1,28		
	Tempo Médio de Germinação (TMG) dias		
<i>V. bahiana</i>	9,74 aC	31,67 aA	23,20 bB
<i>H. castellanosii</i>	6,38 bC	12,93 bB	25,63 aA
<i>E. spectabile</i>	4,96 cC	12,92 bB	22,51 bA
CV (%)	0,26		

Médias seguidas por letras diferentes minúscula na linha e maiúsculas nas colunas para cada variável analisada, não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

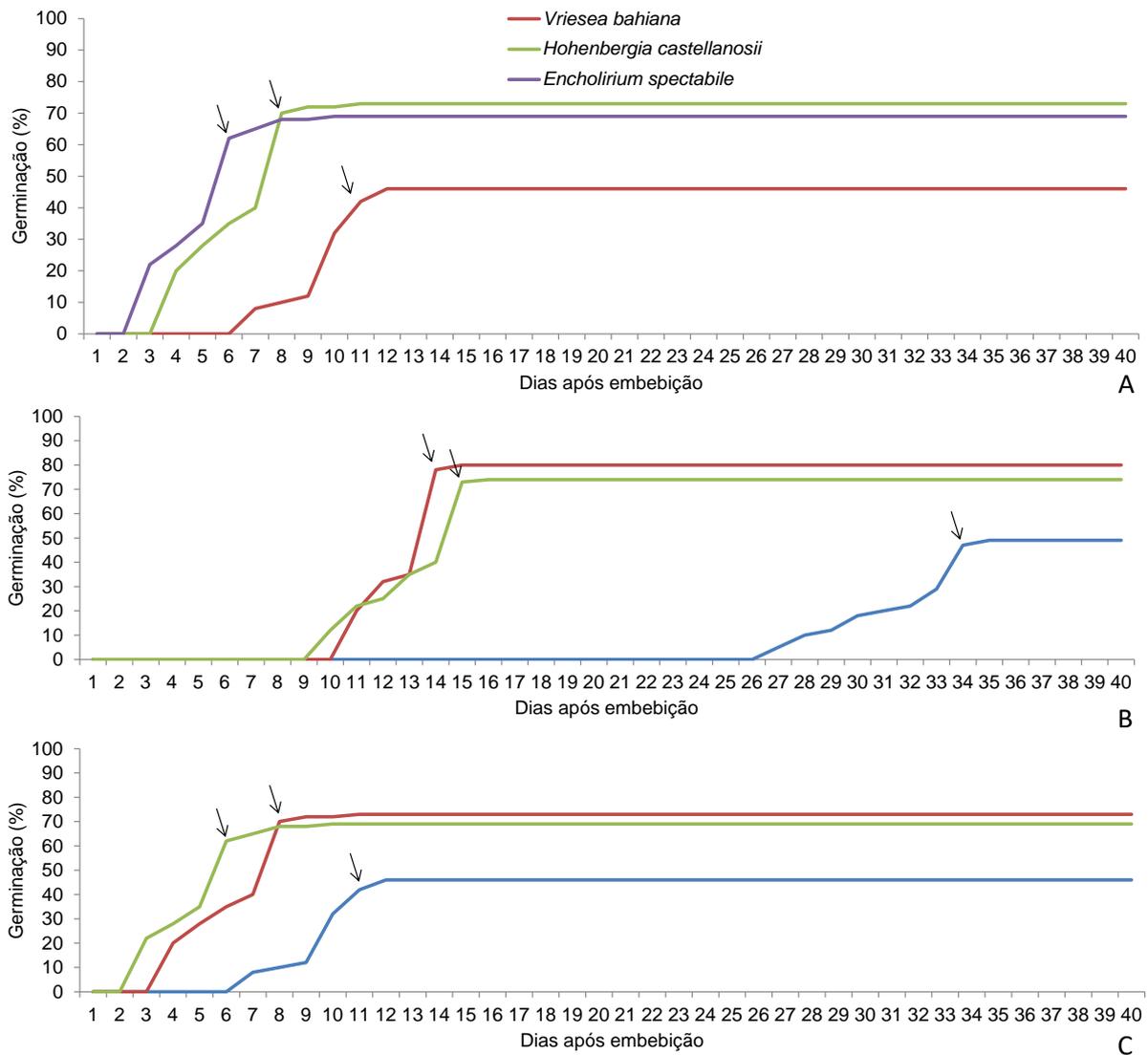
O maior índice de velocidade de germinação foi observado no papel Germitest® para as espécies *E. spectabile* e *H. castellanosii* com 15,63 e 12,54, respectivamente. Comparando os três substratos utilizados, o papel Germitest® apresentou IVG superior aos demais, enquanto a areia lavada apresentou os menos índices de velocidade de germinação para as três espécies estudadas (Tabela 1).

Em relação ao tempo médio de germinação em dias, o papel Germitest® apresentou o menor tempo de germinação, independente da espécie, com valores de 4,96 dias para *E. spectabile* a 9,74 dias para a *V. bahiana*. Os maiores tempos médios de germinação foram observados na *V. bahiana* com o substrato Vivato® (31,67 dias) e nas outras duas espécies em areia lavada (Tabela 1).

O início da germinação para todas as espécies variou conforme os substratos. Para *V. bahiana* as primeiras sementes a germinar foram em papel Germitest®, com início no 7º dia e pico de germinação no 11º dia, seguido de areia lavada, cujo início da germinação ocorreu no 20º dia e pico de germinação no 25º dia. Para essa espécie, o tratamento mais tardio foi o uso de substrato Vivato®, com o início da germinação registrado no 27º dia e um pico de germinação no 35º dia (Figura 1A).

Para a *H. castellanosii*, o início da germinação ocorreu no 4º dia, com pico no 8º dia em papel Germitest®. Já em substrato comercial Vivato®, a germinação iniciou no 11º dia, com um pico de germinação no 14º dia. Em areia lavada, a germinação foi a mais tardia iniciando no 22º dias, com o pico de germinação no 28º dia (Figura 1B).

Como nas outras espécies, o papel Germitest® favoreceu uma germinação mais precoce em *E. spectabili* com início da germinação no 3º dia, e o pico no 6º dia, enquanto que as sementes colocadas em substrato Vivato® iniciaram sua germinação no 10º dia, com o pico registrado no 15º dia. A areia lavada registrou a germinação mais tardia, começando no 19º e com o pico aos 25 dias após sua inoculação neste tipo de substrato (Figura 1C).



**Figura 1.** Porcentagem de germinação acumulada após a embebição das sementes nas três espécies de bromélias. A) Papel Germitest®; B) Substrato Vivato®; C) Areia lavada. Setas indicam o pico de germinação.

As menores porcentagens de germinação de *V. bahiana*, independente do substrato confirmam o padrão reportado para outras espécies do gênero *Vriesea*, em condições naturais (DROSTE et al., 2005). Entretanto, em condições de temperatura e umidade controladas, estes índices podem ser elevados (MERCIER; GUERREIRO FILHO, 1990).

Para a família Bromeliaceae, a germinação é ainda um dos aspectos menos estudados (BARBOSA, 2005; WRINKLER et al., 2005) e a confirmação de quais

fatores são determinantes na germinação *ex situ* ainda permanecem em aberto para a grande maioria das espécies.

Entretanto, o ensaio realizado permite algumas inferências relevantes quanto à grande adaptabilidade das bromeliáceas de forma geral. Os resultados obtidos, demonstram a capacidade germinativa das espécies tanto em condições terrestres, como observado no substrato comercial. Já a areia lavada, que permite um paralelo com a condição rupestre das bromélias, deixou evidente que apesar da germinação ser mais tardia, provavelmente pela condição de maior aridez, ela é bastante eficiente e segue os percentuais de germinação das espécies em outros substratos.

### **Morfoanatomia do desenvolvimento pós-seminal**

O peso de mil sementes foi de 1,53 g para *V. bahiana*, 2,82 g para *H. castellanosii*, 2,63 g para *E. spectabile*. Essa medida, que em geral é usada para calcular a densidade de sementeira e o peso da amostra de trabalho, pode ser um indicador da qualidade das sementes, assim como do seu estado de maturidade e sanidade (BRASIL, 2009).

As sementes de *V. bahiana* são pequenas (7,2 mm de comprimento, 0,9 mm de largura e 0,4 mm de espessura), leves, filiformes, inseridas em frutos do tipo cápsula fina, possuem coloração amarronzada clara quando imaturas e amarronzadas escuras quando maduras. As sementes apresentam apêndice plumoso longo (Figura 2A), esbranquiçado em apenas uma das extremidades das sementes, podendo ser facilmente transportada pelo vento.

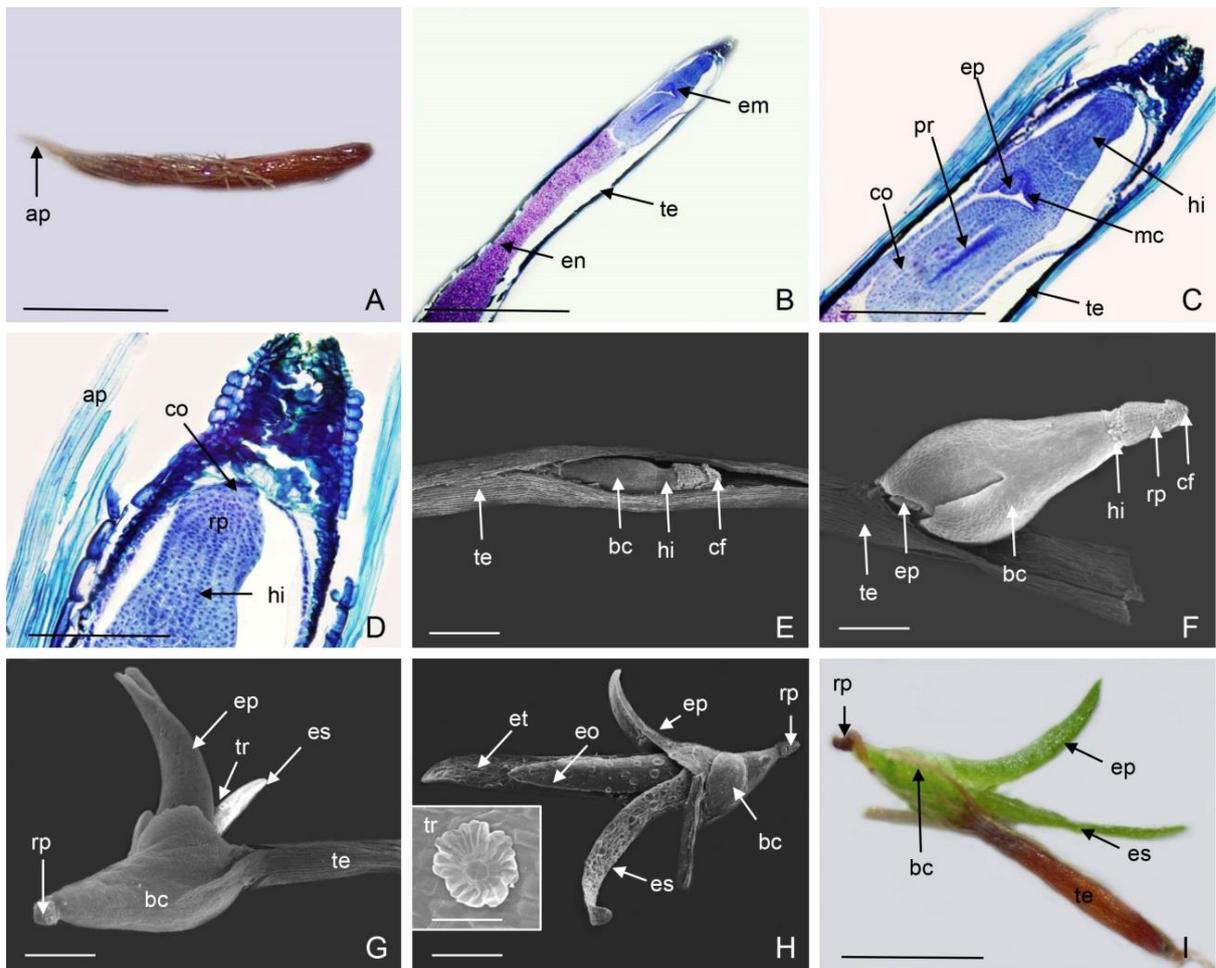
Em secção longitudinal da semente, logo no início da germinação, é possível observar a presença do cotilédone haustorial no interior do tegumento da semente, em contato com o endosperma (Figura 2B-C). O hipocótilo também foi observado, ainda que bem reduzido, o qual pode ser verificado entre a bainha cotiledonar e a raiz primária (Figura 2B-C). Não é possível verificar a distinção do meristema radicular das demais estruturas anatômicas. O meristema caulinar é bem definido e envolto com o primeiro eófilo (Figura 2C).

O início da germinação iniciou-se ao 7º dia a partir da extremidade do apêndice plumoso com a extrusão da raiz primária ainda rudimentar e exposição da bainha cotiledonar (Figura 2E). No 12º dia, inicia-se a extrusão do primeiro eófilo (Figura 2F)

e aos 15º dia o segundo eófilo (Figura 2G). Nessa etapa verificam-se os primeiros tricomas escamiformes sobre a superfície da epiderme foliar, intensificando nos demais eófilos (Figura 2G-H). Anatomicamente o segundo eófilo possui características morfológicas similares ao primeiro. Observa-se também uma sobreposição do primeiro eófilo em relação ao segundo, formando um tanque característico dessa espécie (Figura 2G-I). Ao final dos 35 dias, já observa-se a plântula jovem com inúmeros tricômas (Figura 2H-I).

As características observadas nessas sementes, também foram observadas por Mantovani e Iglesias (2005) para a espécie de *Vriesea neoglutinosa* Mez, Pereira et al., (2008) para *V. heterostachys* (Baker) L.B.Sm. e *Alcantarea imperialis* Harms e Silva e Scatena (2011) para *Tillandsia adpressiflora* Mez. As diferenças observadas entre esses trabalhos e os resultados aqui apresentados, são principalmente relacionadas aos intervalos de tempo durante as fases.

Em *T. adpressiflora* (Tillandsioideae), o início da germinação foi marcada pela emergência do cotilédone, mesmo padrão de desenvolvimento pós-seminal verificado em outras espécies do gênero *Tillandsia* (SILVA; SCATENA, 2011). Para outras espécies da subfamília Tillandsioideae como *V. heterostachys* e *A. imperialis* a primeira estrutura a emergir é a bainha cotiledonar e a raiz primária rudimentar (PEREIRA et al., 2008). Esse caráter pode ser considerado derivado e tem importância taxonômica para esta subfamília.



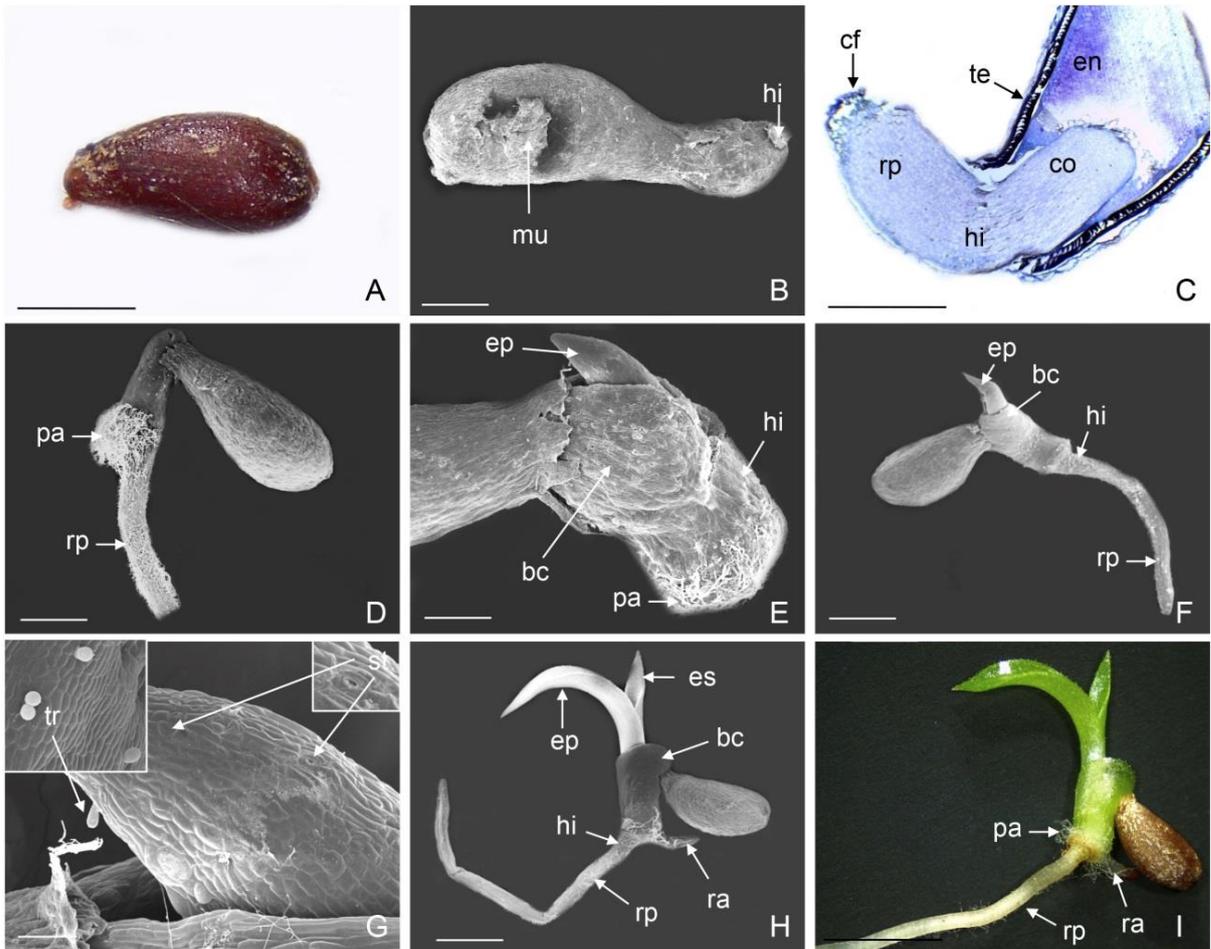
**Figura 2.** Morfologia da semente e desenvolvimento pós-seminal em *Vriesea bahiana* LEME. A) Semente madura, observando-se apêndice plumoso. B- I) Fases do desenvolvimento pós-seminal. Sendo a observação realizada em microscopia de luz (A, B, C, D, I) e microscopia eletrônica de varredura (E, F, G, H). (B- D) início da germinação, onde foi possível observar a presença do cotilédone haustorial no interior do tegumento da semente, em contato com o endosperma, procâmbio bem definido e raiz primária vestigial, de tamanho reduzido, com a presença da coifa. (E) germinação observada ao 7º dia a partir da extremidade do apêndice plumoso com a extrusão da raiz primária ainda rudimentar e exposição da bainha cotiledonar. (F) germinação ao 12º dia observando-se a extrusão do primeiro eófilo. (G-I) germinação ao 15º dia observando-se o segundo eófilo e os primeiros tricomas escamiformes sobre a superfície da epiderme foliar, intensificando nos demais eófilos. Observa-se também uma sobreposição do primeiro eófilo em relação ao segundo, formando um tanque característico dessa espécie (Figura 2G-I). (em) embrião; (en) endosperma; (co) cotilédone; (pr) procâmbio; (mc) meristema apical caulinar; (eo) eófilo; (hi) hipocótilo;

(ap) apêndice plumoso; (ep) eófilo primário; (cf) coifa; (es) eófilo secundário; (et) eófilo terciário; (bc) bainha cotiledonar; (rp) raiz primária; (te) tegumento; (tr) tricoma. Barras: A-D= 0,2 cm; E-H= 500 µm.

As sementes de *H. castellanosii* são pequenas (1,8 mm de comprimento, 1,2 mm de largura e 1,4 mm de espessura), são mais pesadas em comparação às demais, ovaladas, inseridas em frutos do tipo baga, elípticas, lisa sem qualquer tipo de apêndice, e estão envolvidas numa substância mucilagínosa (Figura 3A). Van Der Pijl (1982), Benzing (2000) e Scatena et al.(2006) descrevem que a mucilagem nas sementes de bromélias servem como proteção contra a dessecação.

A espécie *H. castellanosii* possui germinação epigea com início da germinação ao 4º dia após embebição com a extrusão da raiz primária e alongamento da região do hipocótilo, pelo rompimento do tegumento (Figura 3 B-C). Mediante as análises morfológicas, observa-se o cotilédone haustorial em formato cilíndrico no interior do tegumento da semente em contato com o endosperma (Figura 3C). Observa-se a coifa envolta da raiz primária cilíndrica e bem desenvolvida (Figura 3C). O cotilédone não é separado do tegumento da semente, mantendo o haustório no interior da semente (Figura 3B-I). Segundo Garwood, citado por Pereira et al. (2008), essa estrutura corresponde ao cotilédone haustorial e é responsável pela absorção e transferência de reservas de endosperma para o crescimento de plântulas.

No 8º dia observa-se a extrusão da bainha cotiledonar foliácea cupiliforme e eófilo primário com presença de tricômas glandulares (Figura 3E-G), além de inúmeros pelos absorventes no colo e base do hipocótilo, bem como na raiz primária (Figura 3D). Observa-se presença de tricômas glandulares e estômatos esparsos já no primeiro eófilo, aumentando em quantidade conforme o desenvolvimento da plântula (Figura 3G). No 18º dia, o hipocótilo e o eófilo primário alonga-se e observa-se a emissão do eófilo secundário, bem como o início da formação de raízes adventícias (Figura 3H-I). As folhas se formam em rosetas e são dos tipos cupuliformes imbricadas (Figura H-I).



**Figura 3.** Morfologia da semente e desenvolvimento pós-seminal em *Hohenbergia castellanosii* L.B.Sm. & Read. (A) Semente madura, observa-se uma substância mucilaginosa em seu entorno. (B-I) Fases do desenvolvimento pós-seminal. Sendo a observação realizada em microscopia de luz (A, C, I) e microscopia eletrônica de varredura (B, D, E, F, G, H). (B-C) observa-se a extrusão da raiz primária e alongamento da região do hipocótilo, pelo rompimento do tegumento. (C) Observa-se o cotilédone haustorial em formato cilíndrico no interior do tegumento da semente em contato com o endosperma a coifa envolta da raiz primária cilíndrica e bem desenvolvida; (D) observa-se inúmeros pelos absorventes no colo e base do hipocótilo, bem como na raiz primária; (E-G) observa-se no 8º dia observa-se a extrusão da bainha cotiledonar foliácea cupuliforme e eófilo primário com presença de tricômas glandulares; (H-I) observa-se no 18º dia, o hipocótilo e o eófilo primário alongado e a emissão do eófilo secundário, bem como o início da formação de raízes adventícias. Observa-se também as folhas que se formam em rosetas e são do tipo cupuliformes imbricadas. (en) endosperma; (co) cotilédone; (hi) hipocótilo; (ep) eófilo

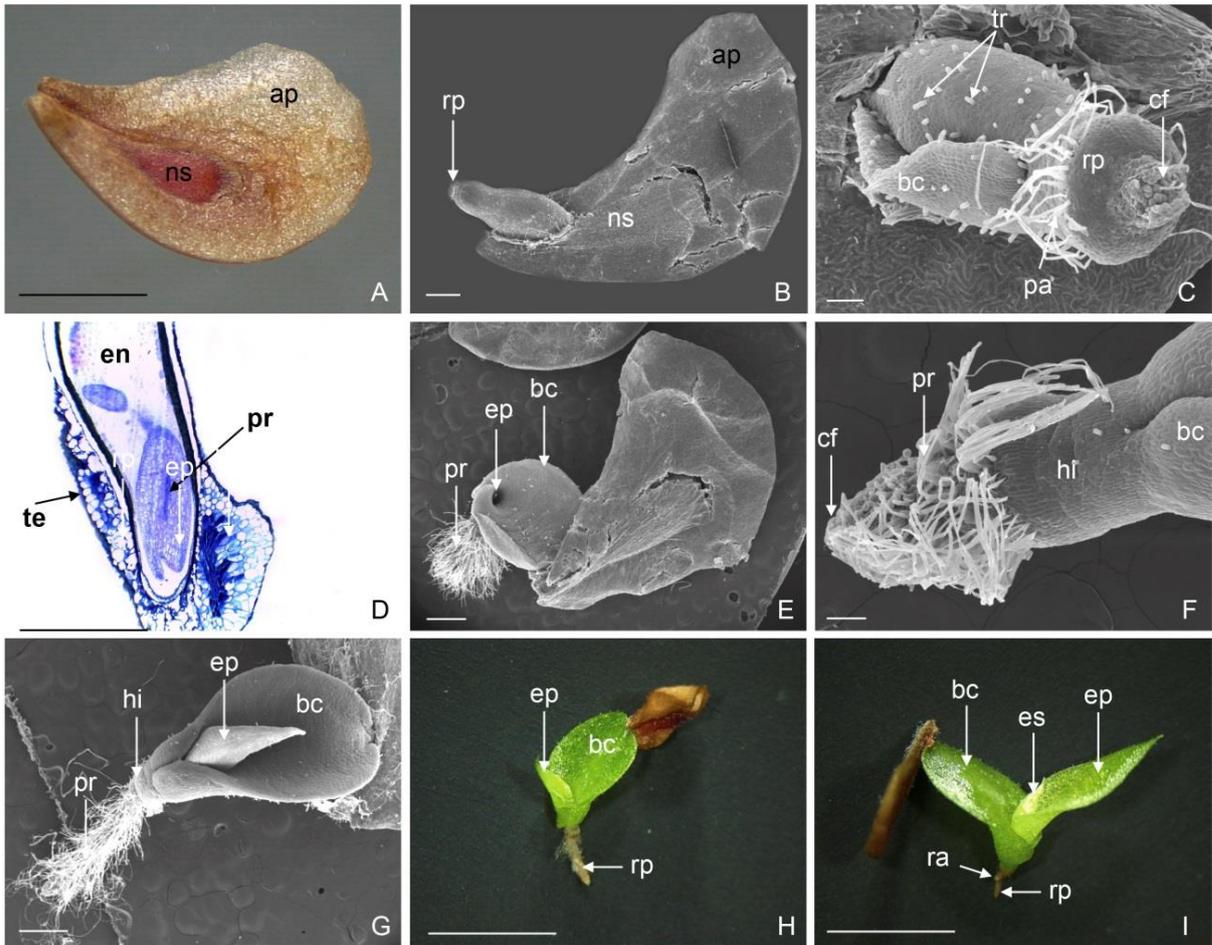
primário; (cf) coifa; (es) eófilo secundário; (bc) bainha cotiledonar; (rp) raiz primária; (pa) pêlos absorventes; (st) estômatos; (tr) tricoma, (um) mucilagem; (ra) raiz adventícia. Barras: A,C,I= 0,4cm; B-H= 500 µm

As sementes de *E. spectabile* são pequenas (8,2 mm de comprimento, 10 mm de largura e 0,1 mm de espessura), ovaladas-achatadas, discoides, inseridas em frutos do tipo cápsulas, septícidas, possuem coloração amarronzada, com um tom castanho mais escuro na região que delimita o embrião. Apresentam apêndice alado membranáceo, podendo ser facilmente transportada pelo vento ou pela água (Figura 4A).

A germinação das sementes iniciou no 3º dia após embebição com o rompimento do tegumento e extrusão da raiz primária recoberta pela coifa (Figura 4B-C). Observa-se um geotropismo positivo da raiz primária e o cotilédone se eleva por alongamento do hipocótilo.

No 5º dia observou-se a extrusão da bainha cotiledonar foliácea cupiliforme. Inúmeros tricomas tectores e glandulares foram observados na bainha cotiledonar bem como pelos absorventes na região do colo bem delimitado (Figura 4C). Observa-se o cotilédone haustorial no interior do tegumento e em contato direto com o endosperma (Figura 4D). Ao 8º dia iniciou-se o desenvolvimento do primeiro eófilo com formato lanceolado (Figura 4E-G). No 12º dia o primeiro eófilo já apresenta formação de um pequeno tanque (Figura 4G-H). Aos 15 dias, a plântula jovem emite o segundo eófilo e inicia a formação de raízes adventícias. Nessa etapa a raiz primária é curta com bastante pelos absorventes.

Nossos estudos apresentaram similaridades com as espécies de *Dyckia duckey* e *D. racemosa* (SILVA; SCATENA, 2011).



**Figura 4.** Morfologia da semente e desenvolvimento pós-seminal em *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. (A) Semente madura, observando-se o núcleo seminífero e o apêndice alado. (B- I) Fases do desenvolvimento pós-seminal. Sendo a observação realizada em microscopia de luz (A, B, C, D, I) e microscopia eletrônica de varredura ( E, F, G, H). (B- C) observa-se a germinação no 3º dia após embebição com o rompimento do tegumento e extrusão da raiz primária recoberta pela coifa; (C) observa-se no 5º dia a extrusão da bainha cotiledonar foliácea cupiliforme e a presença de inúmeros tricomas tectores e glandulares na bainha cotiledonar bem como pelos absorventes na região do colo bem delimitado; (D) observa-se ao 8º dia o desenvolvimento do primeiro eófilo com formato lanceolado (E-G) observa-se no 12º dia o primeiro eófilo já apresentando uma formação de um pequeno tanque (G-H) observa-se aos 15 dias, a plântula jovem emitindo o segundo eófilo e iniciando a formação de raízes adventícias. Nessa etapa a raiz primária é curta com bastante pelos absorventes. (ap) apêndice; (ns) núcleo seminífero; (en) endosperma; (pr) procâmbio; (hi) hipocótilo; (ep) eófilo primário; (cf) coifa; (es) eófilo secundário; (bc)

bainha cotiledonar; (rp) raiz primária; (tr) tricoma; (ra) raízes adventícias. Barras: A-D= 0,2 cm; E-H= 500 µm.

### **Criopreservação das sementes**

A análise de variância, evidenciou que as espécies se comportaram de forma diferente entre si, à medida que é reduzido a umidade nas sementes em relação ao tempo de dessecação em sílica. Os resultados podem ser observados na (Tabela 2).

No que se refere à germinação em ausência de nitrogênio líquido (NL-), as sementes que não foram dessecadas (controle) apresentaram porcentagens de sementes germinadas maiores do que os tratamentos em sílica. Confirmando resultados anteriores, a *V. bahiana* registrou a mais baixa porcentagem de germinação (52%) quando comparada com *H. castellanosii* (83%) e *E. spectabilis* (74%).

Entretanto à medida que se aumentou o tempo de dessecação na sílica, as espécies apresentaram comportamentos diferentes entre elas. As sementes de *H. castellanosii* tiveram uma queda drástica com o aumento do tempo de dessecação variando de 84% no tempo de 2h a 26% em 24h de exposição à sílica. Já para *E. spectabilis* essa queda foi menor com uma porcentagem de germinação de 72% no tempo de 2h a 68% em 24 h deixando evidente uma maior dificuldade para a retirada de água de suas sementes. As sementes de *V. bahiana*, no entanto, apresentam uma germinação que decresce até o tempo de 6 h (33%) para então aumentar, no tempo de 24 h, para 43% de sementes germinadas.

Esse comportamento de *V. bahiana*, se mantém após a criopreservação (NL+) com as taxas de germinação mais elevadas entre as três espécies, que foram de 85% em 12 h e 95% em 24 h de dessecação, registrando um caso claro de quebra de dormência. Lorenzi (2002) relata que existem alguns métodos para a quebra de dormência como: escarificação química, mecânicas e estratificação térmica (choque de temperatura), para enfraquecer seu tegumento e permitir a absorção de água. Quebra de dormência por imersão em nitrogênio líquido tem sido observada para sementes de abacaxi, que costumam apresentar germinação mediana, entre 40 e 60% (dados não apresentados). Outras são substâncias inibidoras da germinação que precisam ser removidas para promover a germinação.

**Tabela 2.** Umidade, porcentagem de germinação após dessecação e nitrogênio líquido das sementes de *Vriesea bahiana*, *Encholirium spectabile* e *Hohenbergia castellanosii*.

Tempo de Dessecação	<i>Vriesea bahiana</i>	<i>Hohenbergia castellanosii</i>	<i>Encholirium spectabile</i>
% de Umidade			
Controle	7,5	2,2	7,2
2h	6,8	2,2	7,2
4h	6,8	2,2	7,2
6h	6,7	2,1	6,9
12h	6,3	1,7	6,8
24h	5,9	1,5	6,1
% de Germinação (NL-)			
Controle	52 aC	83 aA	74 aB
2h	45 bcC	84 aA	72 aB
4h	30 dB	56 bA	60 cA
6h	33 dC	50 bB	69 bA
12h	42 cB	37 cB	67 bA
24h	43 cB	26 dC	68 bA
CV (%)		4,89	
% de Germinação (NL+)			
Controle	61 cdA	65 aA	67 aA
2h	65 cA	61 aA	64 abA
4h	52 eAB	48 bB	57 bcA
6h	54 deA	41 bB	52 cA
12h	85 bA	45 bB	37 dC
24h	95 aA	40 bB	27 eC
CV (%)		4,14	

Médias seguidas por letras diferentes minúscula na linha e maiúsculas nas colunas para cada variável analisada, não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A maioria das espécies possui sementes que toleram dessecação e umidade próximos de 2% a 5%, ou mesmo abaixo desses níveis, sendo denominadas ortodoxas. Por outro lado, quando toleram dessecação e umidade em torno de 10% a 13% são denominadas de “intermediárias” e têm a viabilidade reduzida em graus de umidade inferiores, assim como sementes que não toleram umidade entre 15% e 20% são classificadas como recalcitrantes e apresentam uma queda significativa de sua viabilidade em armazenamento às baixas temperaturas, onde a condição de dessecação é essencial (FONSECA; FREIRE, 2003). Embora, por definição, a secagem de sementes recalcitrantes resulte no declínio da viabilidade, considerável variação na sensibilidade à dessecação tem sido reportada na literatura.

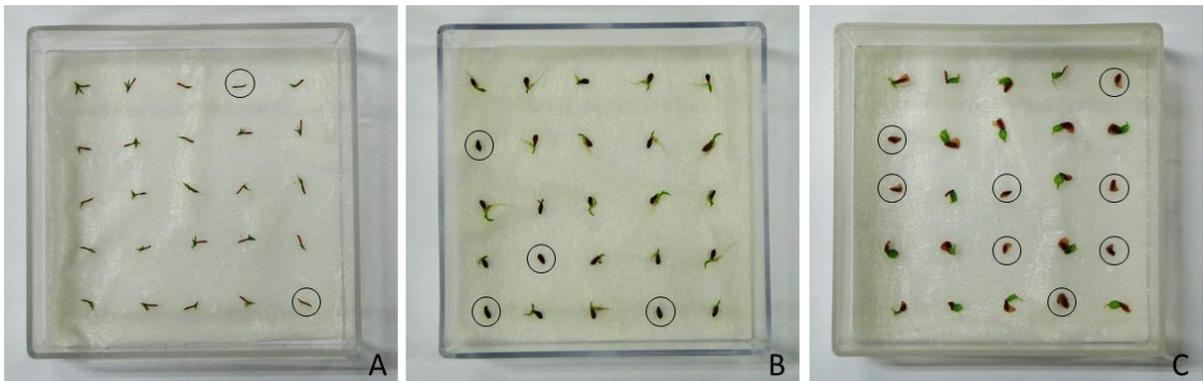
Dos resultados obtidos é possível inferir que *H. castellanosii* tem comportamento de sementes ortodoxas, ainda que apresenta uma queda na germinação após a criopreservação com o melhor resultados tendo sido obtido com sementes desseccadas por duas horas em sílica e umidade de 2,2%.

A baixa umidade nas sementes é fundamental para alcançar o sucesso na criopreservação (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2011) e evitar a formação de cristais com consequentes danos às sementes. Marcos Filho (2005) relatou em seu trabalho que umidade nas sementes entre 10% e 12% permitem a manutenção da germinação por um período de seis a oito meses, para a maioria das espécies e que abaixo desses valores as sementes podem ou não perder a sua viabilidade. No entanto, o que se observa é um comportamento que é bastante variável a depender da espécie e que pode estar relacionado ao tamanho das sementes, já descrito anteriormente. As maiores sementes foram as de *E. spectabile* com 8,2 mm de comprimento, 10 mm de largura e 0,1 mm de espessura, o que pode justificar maiores quantidades de água e portanto mais dificuldade para removê-la nos tempos de dessecação propostos.

Estas observações são consistentes com a hipótese de que nas sementes ortodoxas, há efeitos adversos imediatos sobre a viabilidade das sementes, quando as mesmas possuem baixa umidade e são expostas ao nitrogênio líquido (VERTUCCI, 1979; PRITCHARD, 2004). Apesar de alguns relatos, de que a viabilidade pode ser mantida indefinidamente em sementes criopreservadas, Walters et al. (2004) refutou a ideia de que todo o metabolismo cessa nas sementes ortodoxas, e que há efeitos adversos imediatos sobre a viabilidade das sementes quando elas são excessivamente desseccadas. Prudente et al. (2015) ao trabalhar com sementes de

*Zinnia elegans* Sessé & Moc., também em nitrogênio líquido por 24 horas e tempos de dessecação de 1h, 2h ou 3h, com umidade de 9% não obteve porcentagens de germinação maiores que 60%. Por isso, é importante definir o limite de dessecação para cada espécie, pois a dessecação excessiva pode causar perdas no potencial de germinação em consequência de danos relacionados ao metabolismo do embrião (PAMMENTER et al., 1998; WALTERS et al., 2004; BERJAK et al., 2012).

Resultados semelhantes aos nossos com baixa umidade foram relatados no trabalho de Tarré et al., (2007), com as espécies de *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. e *Dyckia* Schult. & Schult. f; com umidade de 11,2 e 28,2% e em Ferrarier et al. (2016), trabalhando com as espécies de *E. spectabile* com umidade de 8,4%, as taxas de germinação, após imersão em nitrogênio líquido também não foram maiores que 70%. Como a umidade inicial dessas sementes foram baixas, as mesmas ao serem dessecadas por mais tempos, foram prejudicadas com baixas taxas de germinação.



**Figura 5.** Sementes germinadas aos 15 dias após a semeadura de sementes criopreservadas (A) *Vriesea bahianano* tempo de dessecação de 24h. (B) *Hohenbergia castellanosii* e (C) *Encholirium spectabile* no tempo de dessecação de 2h. Círculos evidenciam sementes não germinadas.

## CONCLUSÕES

As três espécies de Bromeliaceae apresentam adaptações facilitadoras da dispersão como mucilagem e apêndices plumosos.

A descrição morfoanatômica do desenvolvimento pós-seminal, permite a caracterização de várias fases para o desenvolvimento pós-seminal das espécies.

Os hipocótilos das plântulas variam entre curtos, alongados ou pouco desenvolvidos.

A criopreservação demonstra que as sementes de *V. bahiana* podem ser criopreservadas com 5,9% de teor de umidade quando dessecadas por 24 horas.

Sementes de *H. castellanosii*, *E. spectabile* podem ser criopreservadas com 2,2% e 7,2% respectivamente, de teor de água quando dessecadas por 2 horas.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, J. G. Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 165-170, 2005.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, 2008. p. 15-32.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. UK: Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; WESLEY-SMITH, J. The effects of various parameters during processing for cryopreservation on the ultrastructure and viability of recalcitrant zygotic embryos of *Amaryllis belladonna*. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 155-169, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA: SDA, 2009. 395 p.
- DROST, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V. J.; ALMEIDA, J. W. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads natives to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 1-8, 2005.
- DROSTE, A.; SILVA MACHADO, A.; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable Bromeliads native to southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.
- DULLOO, M. E. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, p. 2123-2138. 2009.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrante seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic ResourcesNewsletter**. V.112, p.9-18, 1997.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2011.

FAO. 1996. Agricultural production: primary crops. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 17de abril de 2018.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 5, n. 1, p. 123-142, 1968.

FERRARI, E. A. P; COLOMBO, R. C; FARIA, R. T; TAKANE, R. J. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **RevistaCiência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 172-177, 2016.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.2, p.297-303, 2003.

FONTENELLE, A. C. F.; ARAGAO, W. M.; RANGEL, J. H. A. Biometria de frutos e sementes de *Desmanthus virgatus* (L) Willd Nativas de Sergipe. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 252-254, 2007.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO Jr., A. A.; COELHO, M. A. N.; COSTA, A. F.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M. G.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. N.; MAIA, L. C.; Martinelli, G.; Menezes, M.; Morim, M. P.; Peixoto, A. L.; Pirani, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. C. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, v. 62, n. 1, 39-45, 2012.

FORZZA, R. C.; COSTA, A. F.; LEME, E. M. C.; VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L.; LOUZADA, R. B.; MONTEIRO, R. F.; JUDICE, D. M.; FERNANDEZ, E. P.; BORGES, R. A. X.; PENEDO, T. S. A.; MONTEIRO, N. P.; MORAES, M. A. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson & Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pp. 315-397, 2013.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; SALINAS, P.; AMIGO, P. Effect of seed moisture content and cooling rate in liquid nitrogen on legume seed germination and seedling vigour. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 423-434, 2003.

GOSLING, P.G. Viability testing. In: SMITH, R. D.; DICKIE, J. B.; LININGTON, S. L.; PRITCHARD, H. W.; PROBERT, R. J. (Eds.). **Seed conservation turning science into practice**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2003, pp. 445-481.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D., GOUDA, K. **Encyclopaedia of Bromeliads Version 4**. Disponível em: <<http://bromeliad.nl/encyclopedia/>>. Acesso em: 1 Julho 2018.

JORGENSEN, B. Sustainable trade in ornamental horticulture. **Acta Horticulturae**, v. 630, p. 119-123, 2004.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas abóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 4 ed, v.1, 2002.

MANTOVANI, A.; IGLESIAS, R. R. Quando aparece a primeira escama? Estudo comparativo sobre o surgimento de escamas de absorção em três espécies de bromélias terrestres de restinga. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 87, p. 73-84, 2005.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq. 2005. 495 p.

MERCIER, H.; GUERREIRO FILHO, O. Propagação sexuada de algumas espécies de bromélias nativas da Mata Atlântica. **Hoehnea**, v.17, n.2, p.19-26, 1990.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v.67, p.375-495, 2010.

PAMMENTER, N. W.; GREGGAINS, V.; KIOKO, J. I.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; FINCH-SAVAGE, W. E. Effects of differential drying rates on viability retention of *Ekebergia capensis*. **Seed Science Research**, v. 8, n. 4, p. 463-471, 1998.

PÊGO, R. G.; NUNES, U. R.; MASSAD, M. D. Qualidade fisiológica de sementes e desempenho de plantas de rúcula no campo. **Ciência Rural**, p. 341-1346. 2011.

PEREIRA, A. R.; PERERIRA, T. S.; ANDRADE, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós- seminal de espécies de Bromeliaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1150- 1162, 2008.

PRITCHARD, H. W. Classification of seed storage types for ex situ conservation in relation to temperature and moisture. In: GUERRANT, E. O.; KAYRI, H.; MIKE, M.; (Eds.). **Ex situ plant conservation**. London: Island Press, 2004. pp. 139-161.

PRUDENTE, D. O.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; SANTOS, P. A. A.; NERY, M. C.; PAIVA, P. D. *In vitro* germination and cryopreservation of *Zinnia elegans* seeds. **Ornamental Horticulture**. v. 21, n. 2, p. 243-250. 2015.

SAS INSTITUTE INC. SAS/ STAT user´ s guide: statistics. Version 9.1.3. ed. Cary, NC, 2010.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S.; COAN, A. I. Seed Morphology and Post- Seminal Development of *Tillandsia L.* (Bromeliaceae) from the “Campos Gerais”, Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n.6, p. 945-951, 2006.

SILVA, B. M. S.; MÔRO, F. V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. - Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 195-201, 2008.

SILVA, I. V.; SCATENA, V. L. Morfologia de sementes e estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. **Rodriguésia**, v. 62, n. 2, p. 263- 272. 2011.

TARRÉ, E; PIRES, B. B. M; GUIMARÃES, A. P. M; CARNEIRO, L. A; FORZZA, R.C; MANSUR, E. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. & Schult. f. species (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 777-783, 2007.

VERTUCCI, C. W. The effects of low water contents on physiological activities of seeds. **Physiologia Plantarum**, p. 172–176.1979.

VORONKOVA, N. M.; KHOLINA, A. B. Conservation of endemic species from the Russian Far East using seed cryopreservation. **The Biological Bulletin**, v. 37: n. 5, p. 581-586, 2010.

WALTERS. C; WHEELER L.; STANWOOD, P.C. Longevity of cryogenically stored seeds. **Cryobiology**, v. 48, n. 3, p. 229-244, 2004.

WINKLER, M.; HÜLBER, K.; HIETZ, P. Effect of canopy position on germination and seedling survival of epiphytic bromeliads in a Mexican Humid Montane Forest. **Annals of Botany**, v. 95, n. 6, p. 1039-1047, 2005.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação de recursos genéticos vegetais é um tema de importância mundial, já que muitas espécies estão em risco de extinção e várias desaparecem todos os dias do seu habitat natural. A proteção de espécies frente à iminente extinção é, portanto, uma questão prioritária, o que demanda estratégias de conservação eficientes. O processo de extinção está relacionado ao desaparecimento de espécies em um determinado ecossistema e ao longo do tempo. A ação antrópica vem contribuindo bastante o avanço dessa perda de algumas espécies, caso das Bromeliaceae.

As espécies *Alcantarea nahoumii* (Leme) R. J. Grant, *Vriesea bahiana* Leme, *Hohenbergia castellanosi* L.B.Sm. & Read e *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f., do presente estudo, são endêmicas do Brasil e se encontram na categoria de alta vulnerabilidade e por isso foram objetos desse trabalho. Ocorrências naturais, como incêndios aliadas às ações antrópicas são a causa dessa situação atual.

Os estudos referentes à micropropagação e conservação *in vitro* para *Alcantarea nahoumii* (Leme) R. J. Grant, visou a adaptação de um protocolo de propagação e conservação *in vitro*. Foi notável, diante dos resultados obtidos, a influência das temperaturas sobre a resposta da germinação das sementes dessa espécie. No que tange os tratamentos aos quais foram submetidas, verificou-se a importância da adequação da metodologia às peculiaridades de cada espécie. O protocolo de multiplicação e conservação *in vitro* estabelecido nesse trabalho poderá servir como ponto de partida para estudos mais aprofundados sobre a espécie.

Os resultados que foram obtidos nesse trabalho permitirão a produção de mudas dessas espécies, a fim de oferecer ao mercado essa opção de oferta e tentar, dessa forma, minimizar o extrativismo predatório que vem ocorrendo. Apesar do protocolo de micropropagação ter sido avaliado para *A. nahoumii* pode ser testado e ajustado para as outras espécies. Outro aspecto importante dessa possibilidade de se produzir mudas dessa espécie é o uso para programas de conservação. A preocupação demonstrada no delineamento desse trabalho de se trabalhar a partir de sementes amostradas em uma população natural deveu-se exatamente pelo viés da conservação. Garantir a variabilidade genética da população é fundamental nesse processo.

Por outro lado os resultados obtidos para o estabelecimento de um protocolo de criopreservação das espécies *V. bahiana*, *H. castellanosii* e *E. spectabile* deixaram evidente essa possibilidade como uma estratégia de longo prazo para essas espécies. Adicionalmente, o conhecimento da morfologia da semente bem como do desenvolvimento pós-seminal poderá contribuir para estudos taxonômicos que tenham relação com essas espécies.

Finalmente, o trabalho realizado permitiu um avanço importante na produção de mudas e na conservação das espécies estudadas.

## ANEXOS

### Capítulo 1

**Anexo 1.** Análise de variância para porcentagem de germinação de sementes de *Alcantarea nahoumii* sob diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Meio	2	16466,00	8233,00	398,371	0,0000
Temperatura	3	6568,00	2189,33	105,935	0,0000
Meio x Temperatura	6	878,00	146,33	7,081	0,0000
Erro	36	744,00	20,67		
Total corrigido	47	24656,00			

**Anexo 2.** Análise de variância para índice de velocidade de germinação de sementes de *Alcantarea nahoumii* sob diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Meio	2	4,28	2,12	43,597	0,0000
Temperatura	3	1,76	0,59	11,984	0,0000
Meio x Temperatura	6	0,70	0,12	2,370	0,0495
Erro	36	1,77	0,05		
Total corrigido	47	8,51			

**Anexo 3.** Análise de variância para altura de plantas de *Alcantarea nahoumii* conservadas durante 24 meses *in vitro* em função das concentrações de sais de sacarose no meio de cultura.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Meio	1	11,56	11,56	83,961	0,0000
Sacarose	1	72,09	72,09	523,778	0,0000
Meio x Sacarose	1	3,31	3,31	24,021	0,0000
Erro	36	4,95	0,14		
Total corrigido	39	91,91			

**Anexo 4.** Análise de variância para número de raízes de *Alcantarea nahoumii* conservadas durante 24 meses *in vitro* em função das concentrações de sais de sacarose no meio de cultura.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Meio	1	0,22	0,22	0,458	0,5031
Sacarose	1	0,62	0,62	1,271	0,2670
Meio x Sacarose	1	1,22	1,22	2,492	0,1232
Erro	36	17,20	0,49		
Total corrigido	39	19,77			

## Capítulo 2

**Anexo 1.** Análise de variância para porcentagem de germinação de três espécies de bromélias em diferentes substratos.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Espécie	2	7334,22	3667,11	104,886	0,0000
Substrato	2	214,22	107,11	3,064	0,0632
Espécie x Substrato	4	305,78	76,44	2,186	0,0974
Erro	27	944,00	34,96		
Total corrigido	35	8798,22			

**Anexo 2.** Análise de variância para o índice de velocidade de germinação de três espécies de bromélias em diferentes substratos.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Espécie	2	194,03	97,02	16189,350	0,0000
Substrato	2	462,96	231,48	38628,141	0,0000
Espécie x Substrato	4	101,73	25,43	4244,147	0,0000
Erro	27	0,16	0,006		
Total corrigido	35	758,89			

**Anexo 3.** Análise de variância para o tempo médio de germinação de três espécies de bromélias em diferentes substratos.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Espécie	2	442,66	221,33	120480,992	0,0000
Substrato	2	1798,89	899,44	489616,645	0,0000
Espécie x Substrato	4	563,94	140,99	76746,617	0,0000
Erro	27	0,05			
Total corrigido	35	2805,53			

**Anexo 4.** Análise de variância para a porcentagem de germinação após dessecação das sementes de *Vriesea bahiana*, *Encholirium spectabile*, *Hohenbergia castelanosii*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Espécie	2	9107,11	4553,56	510,149	0,0000
Tempo	5	6542,44	1308,49	146,594	0,0000
Espécie x Tempo	10	6474,22	647,42	72,533	0,0000
Erro	54	482,00	8,92		
Total corrigido	71	22605,78			

**Anexo 5.** Análise de variância para a porcentagem de germinação após dessecação e imersão em nitrogênio líquido das sementes de *Vriesea bahiana*, *Encholirium spectabile*, *Hohenbergia castelanosii*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Espécie	2	5383,11	2691,56	365,186	0,0000
Tempo	5	2263,11	452,62	61,411	0,0000
Espécie x Tempo	10	10995,56	1099,56	149,186	0,0000
Erro	54	398,00	7,37		
Total corrigido	71	19039,78			