

## EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SALINA E DE GA<sub>3</sub> NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Pitcairnia flammea* E *Canistropsis billbergioides* (Bromeliaceae)

**Eldelon de Oliveira Pereira, Ester Ujje Nogueira, Geovana Poton Arcobeli Cola, Daniele Vidal Faria, Andreia Barcelos Passos Lima**

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário s/n, Guararema, Alegre, ES, eldelon\_01@yahoo.com.br

**Resumo-** O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos para germinação *in vitro* de duas espécies de bromélias nativas do Distrito de Burarama, Município de Cachoeiro de Itapemirim, ES, testando diferentes concentrações salinas e doses de GA<sub>3</sub>. Para a espécie *C. billbergioides* não houve diferença significativa entre os tratamentos, nos meios de cultura ágar-água, MS ½ e MS, para as variáveis %G e IVG. As sementes apresentaram um padrão de germinação desuniforme e lento, atingindo 33,33% de germinação num período entre 4 e 29 dias após a semeadura. Para a espécie *P. flammea* a média geral foi 97,62% de germinação e não houve diferença significativa entre os tratamentos. A adição de GA<sub>3</sub> na concentração de 5,0 µM ao meio ágar-água foi positiva para incrementar o IVG, apesar do meio MS, independente das concentrações de GA<sub>3</sub>, ser também eficiente na germinação desta espécie. Os resultados deste trabalho contribuem para o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas voltadas ao estabelecimento *in vitro* destas espécies de bromeliaceae como estratégia empregada na conservação de representantes desta família.

**Palavras-chave:** Ácido giberélico, bromeliaceae, germinação *in vitro*, meio de cultura.

**Área do Conhecimento:** Agronomia

### Introdução

Bromeliaceae é uma família bastante representativa para a flora do Estado do Espírito Santo. Compreende aproximadamente 56 gêneros e 3.010 espécies (LUTHER, 2004), destacando-se pelo valor ornamental e grande importância ecológica. Devido a sua beleza, facilidade de cultivo e adaptação aos climas quentes, a espécie *P. flammea* tem sido utilizada como planta ornamental (MAGENTA, 2009). Quanto à *C. billbergioides*, segundo Elias et al. (2006), ela pode ser empregada como biomonitora de elementos químicos na Mata Atlântica, pois sua capacidade acumuladora de elementos químicos diretamente da atmosfera a torna potencialmente aplicável à biomonitoração de poluição atmosférica.

A maior diversidade de espécies localiza-se na região Sudeste, mais especificamente em áreas de Mata Atlântica (PAULA; SILVA, 2004). Entretanto, com o crescimento da utilização de espécies de Bromeliaceae comercialmente, o extrativismo passou a ser uma das principais fontes de abastecimento do mercado, devido à escassez de informações técnicas sobre propagação e cultivo deste grupo de plantas. Nunes e Forzza (2000) afirmam que além do extrativismo, a Família Bromeliaceae está entre os táxons mais susceptíveis a extinção, principalmente, devido à destruição de seu habitat natural, a Mata Atlântica.

O cultivo *in vitro* de bromélias é muito utilizado para fins comerciais, e tem ganhado espaço na preservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (CARNEIRO; MANSUR, 2004; ENGELMANN, 1991). A manutenção *in vitro* assegura o armazenamento de germoplasma e é vantajosa inclusive por proporcionar uma alta taxa de multiplicação, a produção de plantas saudáveis e a representação de grande variedade de genótipos em espaços reduzidos (BELLINTANI et al., 2007).

A composição do meio de cultura pode influenciar o crescimento de plantas cultivadas *in vitro* e a presença de reguladores de crescimento pode promover, inibir ou modificar seus processos fisiológicos (PINHEIRO, 2001). Dentre estes reguladores, as giberelinas (GA<sub>3</sub>) podem interferir nos processos metabólicos que desencadeiam a germinação de sementes (YAMAGUCHI; KAMIYA, 2001; POMPELLI, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2006). O objetivo deste trabalho foi adaptar protocolos para a germinação e o estabelecimento *in vitro* de duas espécies de Bromeliaceae, *P. flammea* e *C. billbergioides*, sob diferentes concentrações salinas e doses de GA<sub>3</sub>. A escolha das espécies foi feita com base no levantamento das espécies de Bromeliaceae ocorrentes no Distrito de Burarama, Município de Cachoeiro de Itapemirim (FARIA et al., 2008).

## Metodologia

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da UFES, em Alegre-ES. Frutos maduros de *C. billbergioides* e *P. flammea* foram coletados de diferentes plantas em populações localizadas no Distrito de Burarama, município de Cachoeiro de Itapemirim. Após a colheita, os frutos foram secos ao ar livre, em local sombreado, por sete dias, para completarem sua deiscência e facilitar a extração das sementes. Após este procedimento foram armazenados em embalagens de papel em geladeira até o uso.

As sementes foram extraídas manualmente e em seguida, na capela de fluxo laminar, desinfestadas em álcool 92,8° por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% por 5 minutos e enxaguadas em água destilada estéril por 3 vezes, sendo mantidas em papel filtro até o momento da inoculação.

Os tratamentos para germinação de *C. billbergioides* foram constituídos de três diferentes meios: ágar-água, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MS ½, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e GA<sub>3</sub> nas concentrações de 0; 10; 20 e 30 μM. Os meios tiveram o pH ajustado para 5,8 e autoclavados durante 20 minutos a 121°C. Após a inoculação as sementes foram mantidas sob fotoperíodo de 16h a 25°C±1. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições e unidade experimental constituída por uma placa de Petri e 3 sementes, totalizando 12 tratamentos, sendo 3x4x4 (3 meios, 4 doses de GA<sub>3</sub> e 4 repetições). A germinação foi avaliada diariamente durante todo o experimento, analisando a Porcentagem de Germinação (%G) e o Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

O experimento com *P. flammea* foi constituído por 2 meios: ágar-água com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Em ambos os meios foram adicionados GA<sub>3</sub> nas concentrações de 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 μM. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (2 meios e 5 doses de GA<sub>3</sub>), totalizando 10 tratamentos, com 10 repetições e unidade experimental constituída por uma placa de Petri contendo 10 sementes. A germinação foi avaliada diariamente durante todo o experimento, analisando a Porcentagem de Germinação (%G) e o Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

O IVG foi determinado segundo a metodologia proposta por Maguire (1962):  $IVG = E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn$ , em que: IVG = índice de velocidade de germinação; E1, E2, ... En = número de sementes germinadas no dia, computadas na primeira, segunda, ... última contagem; N1, N2,...

Nn = número de dias da semente à primeira, segunda,... última contagem.

Os dados referentes à %G e o IVG foram submetidos à análise de variância e testados a 5% de probabilidade sendo comparados pelo teste de Tukey, utilizando o software estatístico SAEG 5.0.

## Resultados

Para a espécie *C. billbergioides* não houve diferença significativa entre os tratamentos, nos três meios de cultura, para nenhuma variável analisada. A espécie apresentou um padrão de germinação desuniforme e lento com média geral da %G de 33,33, alcançada entre 4 e 29 dias após a semente *in vitro* (Figura 1A).

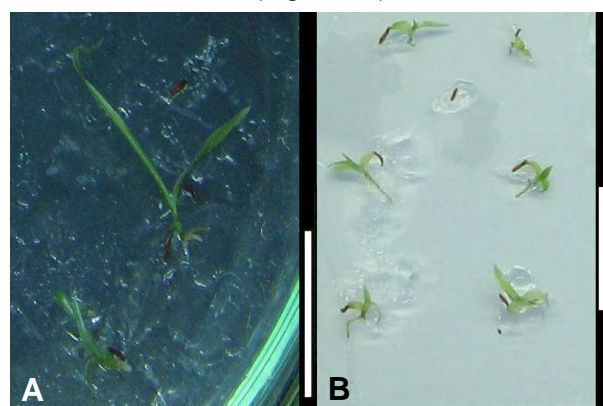


Figura 1. Germinação *in vitro* de *C. billbergioides* (A) e *P. flammea* (B) em meio água-ágar. Barra = 1cm.

Em relação à variável IVG, o meio MS apresentou os menores valores e o meio ágar-água contendo 20 ou 30 μM de GA<sub>3</sub> apresentou os maiores resultados, embora não diferindo estatisticamente das demais concentrações (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *C. billbergioides* em função de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> em meio ágar-água, MS ½ e MS.

GA <sub>3</sub> (μM)	IVG		
	Ágar-água	MS ½	MS
0	0,118 <sup>ns</sup>	0,092 <sup>ns</sup>	0,070 <sup>ns</sup>
10,0	0,137 <sup>ns</sup>	0,075 <sup>ns</sup>	0,097 <sup>ns</sup>
20,0	0,244 <sup>ns</sup>	0,160 <sup>ns</sup>	0,102 <sup>ns</sup>
30,0	0,270 <sup>ns</sup>	0,140 <sup>ns</sup>	0,121 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

No experimento realizado com *P. flammea* (Figura 1B), a média geral da %G foi 97.625 e não

houve diferença significativa entre os tratamentos, nos dois meios de cultura, para esta variável (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância da %G de sementes de *P. flammaea*.

FV	GL	QM	F	SIG.
Total	79			
GA <sub>3</sub>	4	60,625	2,67	0,038
Meio	1	61,250	2,70	0,104
GA <sub>3</sub> *Meio	4	39,375	1,74	0,151 <sup>ns</sup>
Resíduo	70	22,678		
Média Geral	97,625			
CV(%)	4,87			

<sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

No entanto, para a variável IVG, houve diferença significativa entre os tratamentos no meio ágar-água (Tabela 3 e 4).

Tabela 3. Análise de variância do IVG de sementes de *P. flammaea*.

FV	GL	QM	F	SIG.
Total	79			
GA <sub>3</sub>	4	1,405	2,15	0,083
Meio	1	0,844	1,29	0,259
GA <sub>3</sub> *Meio	4	1,660	2,54	0,047*
Resíduo	70	0,652		
Média Geral	3,460			
CV(%)	23,347			

\*Significativo em nível de 5% (P<0,05) pelo teste F.

O maior valor de IVG foi encontrado na presença de 5,0 µM de GA<sub>3</sub>, apesar deste não diferir estatisticamente do meio sem GA<sub>3</sub> ou na presença de 2,5 µM deste regulador (Tabela 4). Portanto, a adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura torna a germinação de *P. flammaea* mais lenta.

Tabela 4. Valores médios para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *P. flammaea* em função de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> em meio ágar-água e MS.

GA <sub>3</sub> (µM)	IVG	
	Ágar-água	MS
0	3,648 ab	3,148 a
2,5	3,401 ab	3,328 a
5,0	4,468 a	3,314 a
7,5	3,321 b	3,807 a
10,0	2,976 b	3,191 a

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

No meio ágar-água foram observados valores de IVG superiores nos tratamentos com concentrações inferiores a 10 µM de GA<sub>3</sub>. Esta média diferiu estatisticamente apenas na concentração de 5,0 µM, não diferindo dos demais resultados. No meio MS este fato não foi observado, apresentando todas as médias estatisticamente semelhantes. Nesta condição, o tratamento acrescido de 7,5 µM de GA<sub>3</sub> apresentou valores ligeiramente superiores aos demais tratamentos.

## Discussão

A baixa taxa de germinação de *C. billbergioides* pode ser considerada aceitável por se tratar de uma espécie nativa, entretanto sugere-se que novos ensaios sejam realizados visando obter maior %G com valores de IVG mais satisfatórios.

Em trabalhos realizados com as bromeliáceas *Aechmea fasciata*, *A. miniata*, *A. burle-marxii*, *Bromelia antiacantha*, *Vriesea* sp e *Aechmea* sp, Moreira et al. (2008) encontraram as maiores médias das taxas de germinação (59% e 58%, respectivamente) quando se adicionou GA<sub>3</sub> ao meio de cultivo, independente da concentração utilizada (1,0 ou 10 µM de GA<sub>3</sub>), mas sem diferirem estatisticamente. Portanto, cada genótipo apresenta exigências próprias para germinação, havendo freqüentemente uma ação conjunta entre vários fatores. Quando ocorrem condições favoráveis, é esperado certo nível de sincronismo de germinação de várias sementes de uma mesma espécie (BEGON et al., 1990; FERREIRA et al., 2001).

De acordo com os dados obtidos no experimento com *P. flammaea*, provavelmente a alta %G e o baixo IVG, mesmo em meio ágar-água, se devem ao hábito terrestre desta bromeliaceae e sua eficiência em obter nutrientes de ambientes pobres (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Pompelli (2006) estudando outro membro da subfamília Pitcairnioideae, *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides*, ao comparar a germinação em meio MS com e sem GA<sub>3</sub>, comprovou que a ausência ou presença do regulador proporcionaram resultados estatisticamente iguais para %G (75,8%).

Altas taxas de %G foram obtidas em outras espécies de bromélia: 74,3% para *Neoregelia cruenta* em meio MS (CARNEIRO et al., 1999), 86,7% em *Tillandsia eizii* (PICKENS et al., 2003) e 90% para *Aechmea nudicaulis* e para *Streptocalyx floribundus* (PINHEIRO; BORGUETI, 2003).

Moreira et al. (2008) não obtiveram germinação das espécies *Aechmea burle-marxii* e *Bromelia antiacantha* em meio MS, mas *Aechmea* sp. apresentou resultados estatisticamente iguais, com 74 e 76% de germinação na presença de 1 e 10 µM de GA<sub>3</sub>, respectivamente. Para as espécies *A. fasciata* e *A. miniata* não houve diferença significativa entre as concentrações de GA<sub>3</sub>, sendo o IVG igual a 1,0 e 5,76, respectivamente e a %G de 100% para ambas as espécies.

Droste et al. (2005) obtiveram altas taxas de germinação com *Vriesea gigantea* e *V. philippocoburgii*, 99 e 89%, respectivamente, em meio MS e na ausência do mesmo regulador.

Aranda-Peres e Rodriguez (2006) verificaram que sementes de *A. bromelifolia* e *A. distichantha* germinaram relativamente bem em meio sem reguladores de crescimento quando comparadas a espécies de Tillandsioideae que apresentaram baixa taxa de germinação. Entretanto *Racinaea* sp. (Tillandsioideae) apresentou %G igual a 62% em meio MS ¼ e o uso de GA<sub>3</sub> não foi significativo.

## Conclusão

Com base nos valores encontrados neste trabalho, a germinação *in vitro* das espécies *C. billbergioides* e *P. flammea* é uma prática viável, embora ajustes devam ser realizados para a espécie *C. billbergioides*. Para esta espécie não houve diferença significativa entre os tratamentos, nos três meios de cultura, para as variáveis %G e IVG.

Para a espécie *P. flammea*, a adição de GA<sub>3</sub> na concentração de 5,0 µM ao meio ágar-água foi positiva para incrementar o IVG, apesar do meio MS, independente das concentrações de GA<sub>3</sub>, ser também eficiente na germinação desta espécie. A adição de GA<sub>3</sub> ao meio ágar-água favoreceu o aumento dos valores de IVG, indicando que a adição deste regulador ao meio de cultura torna a germinação desta espécie mais lenta, sendo o seu uso, portanto, considerado desnecessário.

## Referências

- ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ A. P. M. Bromeliad. In: Aranda-Peres, A. N.; Rodriguez, A. P. M. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. IV Piracicaba: Global Science Books, Cap. 73, p. 644-655. 2006.
- BEGON, M. J.; HARPER, L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology: individuals, populations, and communities**. Massachusetts (USA): Rand McNally, p. 945, 1990.
- BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia – Brasil. Nota Científica. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1101-1103. 2007.
- CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G. J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 79-83, 1999.
- CARNEIRO, L. A.; MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, v. 2, n. 1, p. 12-20. 2004.
- DROSTE, A.; SILVA, A. M.; 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.
- ELIAS, C.; FERNANDES, E. A. N.; FRANÇA, E. J.; BACCHI, M. A. Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, v.6, n.1. 2006.
- ENGELMANN, F. **In vitro conservation of tropical plant germplasm – a review**. Euphytica, 57: 227-243. 1991.
- FARIA, A. P. G.; FAVORETO, F. C.; COUTO, D.; MORENO, M. R. A Família Bromeliaceae Juss. no distrito de Burarama, município de Cachoeiro de Itapemirim- ES (dados preliminares). In: 59<sup>º</sup> CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA: ATUALIDADES, DESAFIOS E PERSPECTIVAS DA BOTÂNICA NO BRASIL, 2008, Natal. **Anais...** Natal: Sociedade brasileira de Botânica, 2008. p. 36-36.

- FERREIRA, A. G.; CASSOL, B.; ROSA, S. G. T.; SILVEIRA, T. S.; STIVAL, A. L.; SILVA, A. A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 15, n. 2, p. 231-242, 2001.
- LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. Sarasota: Bromeliad Society International, 2004. 109 p.
- MAGENTA, M. É possível cultivar bromélias e papoulas como plantas ornamentais em casa? Revista Galileu, maio de 2009. Disponível em: <[http://galileu.globo.com/edic/86/sem\\_duvida1.htm](http://galileu.globo.com/edic/86/sem_duvida1.htm)>. Acesso em: 10 jul. 2010.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. **Crop Sci.**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D.; BASTOS, L. P.; ROCHA, M. A. C. Germinação de sementes *in vitro* de espécies de bromélias ameaçadas de extinção. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 4, p. 321-327, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NUNES, J. V. C.; FORZZA, R. C. Bromélia. In: I SEMINÁRIO NACIONAL DE RECURSOS FLORESTAIS DA MATA ATLÂNTICA, 2000, São Paulo. **Anais...**São Paulo, 2000. p. 40-44.
- PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de bromélia**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 106p.
- PICKENS, K. A.; AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y.; WOLF, J. H. D. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. **HortScience**. v.38, p.101-104, 2003.
- PINHEIRO, C. S.; MEDEIROS, D. N.; MACEDO, COSTA, C. E. Germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.23, n.2, p.413-416, 2001.
- PINHEIRO, F.; BORGHETTI, F. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesebach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Shultes f.) Mez (Bromeliaceae). **Acta Bot. Bras.**, v. 17, n. 1, 2003.
- POMPELLI, M. F. Germinação de *Dyckia encholirioides* var *encholirioides* (Bromeliaceae), Pitcairnioideae). **Floresta e Ambiente**, v.13, n.1, p. 01 – 09, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição, Porto Alegre: Artmed. 2006. p. 705.
- YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; SUN, T. Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellins biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination. **Plant Journal**, Oxford, v. 28 p. 443-453, 2001.