



Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*¹

Evaluating the effectiveness of the propagation of Alcantarea imperialis (Bromeliaceae) cultivated in vitro and ex vitro

Elisa Mitsuko Aoyama,^{2,6} Leonardo de Melo Versieux,³ Catarina Carvalho Nievola⁴
& Solange Cristina Mazzoni-Viveiros⁵

Resumo

O cultivo *in vitro* de bromélias tem sido considerado uma técnica eficiente para aperfeiçoar a sua produção. Contudo, não existem relatos que comparem a eficiência dos métodos de propagação *in vitro* e *ex vitro* da bromélia-imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms utilizada no paisagismo e considerada ameaçada de extinção devido ao extrativismo ilegal. O cultivo *in vitro* surge como uma boa alternativa para se preservar a diversidade genética dessa espécie polimórfica, assegurando a matéria-prima para a evolução contemporânea ocorrer. O objetivo deste trabalho foi comparar o crescimento de plantas de *A. imperialis*, cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, a partir de sementes, estabelecendo o período ideal de transferência para aclimação. As sementes foram submetidas à desinfestação superficial antes de serem transferidas para as condições de cultivo (meio de cultura ou substrato de casca de *Pinus* sp.). Após períodos pré-estabelecidos, plântulas cultivadas *in vitro* foram transferidas para condições *ex vitro* (aclimação). As plântulas provenientes do cultivo *in vitro* apresentaram maiores valores para todos os parâmetros analisados em relação àquelas cultivadas *ex vitro*. Os dados demonstraram que a aclimação de plântulas mantidas *in vitro* por 2, 4 e 6 meses apresentaram maior crescimento, em comparação àquelas aclimatadas após terem sido cultivadas por mais tempo *in vitro*. Os resultados deste trabalho mostram a eficiência do método de cultivo *in vitro*, indicando o tempo ideal para a permanência das plântulas nos meios nutritivos, estabelecendo importante relação custo-benefício para sua produção.

Palavras-chave: aclimação, bromélia-imperial, conservação *ex situ*, micropropagação, sementes.

Abstract

The *in vitro* cultivation of bromeliads has been considered an effective technique to improve its production. However, there are no studies that compare the efficiency of the methods of *in vitro* propagation versus *ex vitro* for the Brazilian giant bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms used in landscaping and considered to be endangered due to illegal extraction. The *in vitro* culture appears as a good alternative to preserve the genetic diversity of this polymorphic species, assuring that the raw material for the contemporary evolution will be available. The aim of this study was to compare the growth of plants of *A. imperialis* *in vitro* and *ex vitro* obtained from seed, establishing the ideal transfer period. The seeds were disinfected before being transferred to culture conditions (culture medium or *Pinus* sp. bark substrate). After the pre-established growing time, *in vitro* plants were transferred to *ex vitro* (acclimatization). Plants from *in vitro* cultures showed higher values for all measured parameters compared to those grown *ex vitro*. The data showed that the acclimation of plants cultivated *in vitro* for 2, 4, and 6 months showed better growth compared to those acclimated after being cultured *in vitro* for longer time. These results show the efficiency of the *in vitro* culture method, indicating the ideal time for the maintenance of the plants in nutrient media, providing important cost-benefit ratio for production.

Key-words: acclimatization, Brazilian giant bromeliad, *ex situ* conservation, micropropagation, seeds.

¹ Parte da tese de Doutorado da primeira autora, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

² Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Depto. Ciências Agrárias e Biológicas, Rod. BR 101 Norte km 60 s/n, 29932-540, São Mateus, ES.

³ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Depto. Botânica, Ecologia e Zoologia, 59072-900, Natal, RN.

⁴ Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, C.P. 68041, 04045-972, São Paulo.

⁵ Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Anatomia, C.P. 68041, 04045-972, São Paulo.

⁶ Autor para correspondência: elisaoyama@yahoo.com.br

Introdução

A produção de bromélias em escala comercial é atividade viável e tem sido bastante explorada no Brasil, seguindo os passos de outros países, como os Estados Unidos, a Holanda e a Bélgica. A qualidade das plântulas assim obtidas é superior àquela de extrações criminosas em florestas (Melo 1996), fato este que, unido ao preço acessível, coloca as plantas cultivadas em grande vantagem no mercado. Dentre as técnicas de produção das espécies vegetais, a propagação por meio de técnicas de cultivo *in vitro* apresenta inúmeras vantagens, se comparada à produção em sistemas convencionais em estufa (Debergh & Maene 1981; Pierik 1987; Debergh 1994; Fay 1994; Engelmann 1997; Thorpe & Harry 1997; Hartmann *et al.* 2002; Carneiro & Mansur 2004), sendo um importante método de propagação para espécies ameaçadas de extinção e/ou ornamentais (Engelmann 1991; Fay 1994; Sarasan *et al.* 2006).

Dentre as espécies de bromélia de interesse ornamental, destaca-se a *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, conhecida popularmente como bromélia-imperial ou bromélia-gigante (Versieux & Wanderley 2009). Esta espécie está incluída na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA 2008). A bromélia-imperial caracteriza-se morfológicamente por ser uma herbácea perene de grande porte (>140 cm), heliófila, rupícola ou saxícola, formando grandes populações sobre paredões rochosos principalmente na Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro), embora também por vezes na Serra da Mantiqueira (Minas Gerais) (Barbará *et al.* 2007, Monteiro & Forzza 2008, Versieux 2009). Suas folhas e brácteas apresentam variações da cor verde ao vermelho-escuro ou vinoso. Algumas dessas variações foram chamadas de *color morphs* por Barbará *et al.* (2007). Eventualmente, podem ser variegadas. Apresenta inflorescência densa, com 2–3 metros de altura, ramificada, piramidal, com pedúnculo ereto, excedendo as folhas. O período de floração é de cerca de 5 meses, concentrando-se no verão; as flores são vistosas, visitadas por insetos e beija-flores e polinizadas por morcegos (Martinelli 1997). Essa espécie é amplamente utilizada em projetos paisagísticos não só no Brasil como em outros países. Isso justifica a preocupação com a sua propagação para atender a tal demanda, de modo a evitar que indivíduos adultos sejam retirados de seu

habitat, onde o crescimento tende a ser lento (E.M. Aoyama, dados não publicados).

Para a conservação desta espécie, estabelecer protocolos para seu cultivo *ex situ* é extremamente importante: as populações de *A. imperialis* são naturalmente fragmentadas e geneticamente isoladas entre os distintos afloramentos em que ocorrem, mantendo elevada diversidade genética (Barbará *et al.* 2007, 2008, 2009). Sendo assim, o cultivo *ex situ* surge como uma estratégia para se preservar esta diversidade interpopulacional e atender à exigência atual da biologia da conservação, que apregoa que não basta preservar a espécie ou alguns espécimes. É necessário manter a diversidade genética interpopulacional, matéria-prima do processo de evolução contemporânea (Moritz 2002; Stockwell *et al.* 2003).

Alcantarea imperialis está incluída na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA 2008), conforme consta no Anexo II, considerada com “Dados Deficientes”, o que reforça a necessidade de se estudar todos os aspectos biológicos desta espécie. Apesar da conservação *in situ* ser uma das ações mais propostas pelos ambientalistas, nem sempre isto é viável, sendo necessárias estratégias de conservação *ex situ*, onde indivíduos de determinada espécie são mantidos em cultivo sob supervisão. Dentre essas técnicas, destaca-se o cultivo *in vitro* (Carneiro & Mansur 2004; Sarasan *et al.* 2006), seguido do processo de aclimação *ex vitro*, com diversas aplicações que podem auxiliar não apenas nas etapas de propagação, como também na restauração de ambientes degradados e no fornecimento de material vegetal para outras áreas de pesquisa, como a química de produtos naturais (Pence 2011).

Embora plântulas mantidas *in vitro* tenham o crescimento favorecido, não há relatos sobre a eficiência dessa técnica em comparação com a produção convencional de bromélias em estufa, a partir de sementeira, ou assexuadamente através de propagação vegetativa. Adicionalmente, não foram encontrados trabalhos que visem avaliar o tempo mínimo de permanência das plântulas nos frascos de cultivo antes de serem submetidas à etapa de aclimação, de modo a reduzir os gastos com a manutenção das culturas.

Este trabalho se propôs, assim, a comparar o crescimento de plântulas de *A. imperialis*,

cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, a partir da germinação de sementes, de modo a verificar qual sistema de cultivo é mais adequado à maior produção de mudas, informando as possíveis razões das diferenças. Tendo em vista que a aclimação é uma importante etapa para produção de plântulas via micropropagação, objetivou-se também avaliar qual o tempo mínimo de permanência das culturas *in vitro*, a fim de se obter sucesso no processo de aclimação.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, localizado no Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.

As sementes foram retiradas de frutos maduros de três indivíduos de *A. imperialis* cultivados no Instituto de Botânica (Fig. 1a) que estavam armazenadas por cerca de 3 meses a 10°C. Estas foram testadas quanto à viabilidade, sendo que atingiram 80% de germinação. Após a remoção dos apêndices plumosos, as sementes (Fig. 1b) foram desinfestadas superficialmente com solução de etanol a 70% por cinco minutos, seguida por imersão em solução de benomil 1% por cinco minutos, e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio comercial 4% adicionada de algumas gotas de Tween 20, sendo mantidas durante 60 minutos. Após essa etapa, as sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada. Este procedimento de desinfestação é comumente utilizado para sementes que têm apêndices plumosos como relatado para outras espécies (Aranda-Perez & Martinelli 2009; Pedroso *et al.* 2010).

Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Foram preparados 100 frascos de cultura com 40 ml de meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) modificado para conter metade da concentração recomendada dos macronutrientes e a original dos micronutrientes, suplementação com 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, 0,1 ml l⁻¹ de tiamina, 30 g l⁻¹ de sacarose, 5 g l⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8 antes de ser esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Sob fluxo laminar, 15 sementes já desinfestadas foram inoculadas em cada frasco réplica. O experimento foi conduzido por 12 meses em sala

de cultura com fotoperíodo de 12h, irradiância de 30 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ e temperatura controlada (26 \pm 2°C) (Fig. 1c).

Após 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses de experimento, 50 plântulas para cada período foram avaliadas quanto ao comprimento e número de raízes, comprimento da maior folha, número de folhas sadias (consideradas aquelas totalmente verdes) e senescentes, massas fresca e seca.

Estabelecimento do cultivo *ex vitro*

Para o experimento *ex vitro* foram utilizadas oito caixas tipo “gerbox” forradas com papel de filtro umedecido com água destilada, recebendo cada uma delas 100 sementes. Após 30 dias, as plântulas obtidas foram transferidas para bandejas de isopor contendo casca de *Pinus* sp. compostada como substrato. Para evitar a perda excessiva de umidade, as bandejas foram envolvidas por saco plástico transparente (Fig. 1d), ficando expostas à irradiância de aproximadamente 30 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$. As plântulas foram semanalmente adubadas com solução de MS sem sacarose, sendo aplicados 50 ml de solução por aspersão.

Os ensaios de aclimação foram mantidos na mesma sala de cultura descrita anteriormente, e após 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses de experimento, 50 plântulas para cada período foram avaliadas quanto ao comprimento e número de raízes, comprimento da maior folha, número de folhas sadias e senescentes, massas fresca e seca.

Aclimação

Após 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses de cultivo *in vitro*, 100 plântulas de cada período foram transferidas para as condições *ex vitro* e permaneceram por dois meses nas mesmas condições de luminosidade, temperatura e adubação acima descritas, e ao final dessa etapa foram avaliadas quanto ao comprimento e o número das raízes, comprimento da maior folha, número de folhas sadias e senescentes, massas fresca e seca.

Para os cálculos de incremento de crescimento após o período de aclimação foi utilizada a média dos dados analisados das plântulas cultivadas nas condições *in vitro* em todos os períodos, subtraídos das médias para os mesmos parâmetros das plântulas após a aclimação. O valor resultante foi multiplicado por 100 e dividido pelo valor da média das plântulas *in vitro*.



Figura 1 — *Alcantarea imperialis* — a. aspecto da planta em floração; b. semente com apêndices plumosos; os traços indicam a região onde foram retirados os apêndices; c. frasco de cultivo *in vitro* com plantas jovens (6 meses); d. bandeja com plantas em substrato de casca de *Pinus* envolvida por saco plástico (1 mês); e. planta cultivada por 6 meses em condições *ex vitro*; f. planta cultivada por 6 meses em cultivo *in vitro*; g. bandeja com plantas após o período de aclimação (8 meses). Barra = 50 cm (a), 1 cm (b-f), 10 cm (g).

Figure 1 — *Alcantarea imperialis* — a. flowering plant; b. seeds with feathery appendage, dashes indicate the region where the appendages were removed; c. *in vitro* cultivation vessel with young plants (6 months); d. trays with plants in *Pinus* bark as substrate covered with transparent plastic (1 month); e. plant derived from *ex vitro* culture after six months of growth; f. plant derived from *in vitro* culture after six months of growth; g. trays with plants after the acclimatization (8 months). Bars = 50 cm (a), 1 cm (b-f), 10 cm (g).

Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizada a estatística descritiva, calculando-se o desvio padrão entre as médias obtidas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey (Dias & Barros 2009), utilizando-se o pacote estatístico BioEstat 5.0.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos, apresentados nas Figuras 1 a 4, e nas Tabelas 1 e 2, demonstram que a micropropagação *in vitro* a partir de sementes de *Alcantarea imperialis* propiciou condições de maior desenvolvimento das plântulas em comparação àquelas cultivadas *ex vitro* (Figs. 1e-f). Adicionalmente, indicou o tempo adequado para iniciar a aclimação, contribuindo para a diminuição de custos de manutenção das culturas, confirmando os dados encontrados em trabalhos que utilizaram técnicas de micropropagação com outras espécies de bromélias ameaçadas ou endêmicas visando, também, à sua produção comercial e, conseqüentemente, sua conservação (Mercier & Kerbauy 1995; Mercier & Nievola 2003; Carneiro & Mansur 2004).

Em relação à parte aérea, observou-se que as diferenças entre os tratamentos *in vitro* e *ex vitro* iniciaram-se a partir do segundo mês de cultivo, permanecendo até o final do experimento (Fig. 2a). Houve maior crescimento das plântulas mantidas *in vitro* em relação àquelas cultivadas em bandejas, mesmo constatando que em ambos os tratamentos a germinação ocorreu simultaneamente. Observou-se que a partir do quarto mês de cultivo a diferença no comprimento da maior folha foi aumentando até que as plântulas mantidas *in vitro* atingissem cerca do dobro das cultivadas *ex vitro* (Fig. 2a). Contudo, em relação ao número de folhas, observou-se que apenas após 6 meses as plântulas cultivadas *in vitro* eram significativamente maiores que naquelas cultivadas *ex vitro* (Fig. 2b). Entretanto, após 8, 10 e 12 meses, o número de folhas não foi significativamente diferente entre os tratamentos (12 folhas em média). Nota-se que a partir do 6º mês ocorre a morte das folhas, de modo crescente até o 12º mês, sendo que no tratamento *in vitro* foram observadas nove folhas senescentes, em média, aos 12 meses (Fig. 3). Já na condição *ex vitro* apenas 3 folhas senesceram nesse mesmo tempo de cultivo (Fig. 3). Esses resultados podem

indicar o momento que as plântulas atingiram o crescimento intenso, notadamente para o cultivo *in vitro*, havendo necessidade da realocação dos nutrientes das folhas mais velhas para as mais jovens, pela escassez de algum elemento mineral móvel no corpo vegetal, como por exemplo, os íons de nitrogênio.

O melhor desempenho das plântulas *in vitro* pode ser devido à presença de sacarose no meio de cultura. É reconhecido o importante papel da sacarose como componente do meio de cultura, servindo como fonte de carbono e energia para as plântulas, necessária para compensar a taxa fotossintética que, nessas condições, é prejudicada em função da restrição das trocas gasosas (Torres *et al.* 1998). Contudo, alguns autores atribuem como função dos carboidratos a influência sobre o desenvolvimento de órgãos (Calvete *et al.* 2002). Segundo Kozai (1991), a presença de carboidratos no meio de cultura é importante para o desenvolvimento das raízes, para a multiplicação dos brotos e para o aumento da altura da plântula. Além disso, a presença de sacarose propicia o fornecimento de esqueletos carbônicos necessários à incorporação dos nutrientes (Buchanan *et al.* 2002; Taiz & Zeiger 2009).

Embora não tenham sido encontrados trabalhos que comparem o crescimento de bromélias cultivadas *in vitro* com as cultivadas em estufa, algumas espécies de monocotiledôneas avaliadas apresentaram tais diferenças. Segundo Reuther (1988), em estudo com cultivares de *Spathiphyllum floribundum* (Linden and André) N.E.Br. cv. 'Mauna Loa', notou-se maiores valores de massa seca nas plântulas mantidas em condições *ex vitro*, devido ao pouco desenvolvimento dos tecidos foliares *in vitro*, principalmente os de sustentação, resultando em folhas mais delgadas.

Os resultados de acúmulo de massa corroboram aqueles apresentados em relação ao comprimento das folhas, indicando ter havido um maior crescimento nas plântulas mantidas *in vitro* em comparação ao outro tratamento (Fig. 2a, c-d). Os dados de massas fresca e seca apresentaram as maiores diferenças entre os valores nos períodos de cultivo *in vitro* a partir do sexto mês, quando comparados com os valores das plântulas de mesma idade cultivadas em condições *ex vitro* (Figs. 2c-d).

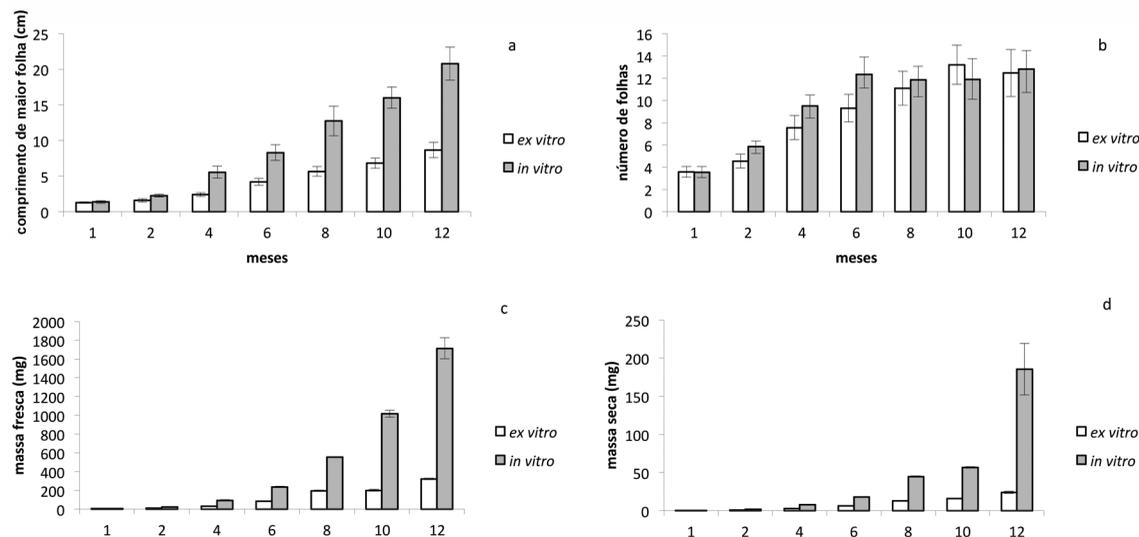


Figura 2 — Crescimento da parte aérea de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e *ex vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses — a. comprimento de maior folha (cm); b. número de folhas; c. massa fresca (mg); d. massa seca (mg). Os valores representam a média e as barras indicam o desvio padrão ($n = 50$).

Figure 2 — Aerial portion growth of *Alcantarea imperialis* cultivated *in vitro* for 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months — a. length (cm); b. number of leaves; c. fresh mass (mg); d. dry mass (mg). The values represented the average and the bars indicated the standard deviations ($n = 50$).

Tabela 1 — Crescimento da parte aérea de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Table 1 — Aerial portion growth of *Alcantarea imperialis* cultivated *in vitro* for 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months and submitted to acclimatization for 2 months.

Período <i>in vitro</i> (meses)	Comprimento (%)	Número de folhas (%)	Número de folhas senescentes (%)	Massa fresca (%)	Massa seca (%)
1	131,88	67,98	*	367,23	257,79
2	145,42	84,93	*	575,22	507,77
4	35,14	13,26	*	81,65	54,94
6	110,79	*	155,70	326,98	267,36
8	72,12	*	*	176,42	158,57
10	12,68	*	*	51,43	93,73
12	15,93	*	2,09	64,09	8,72

(*) tende a zero

Técnicas de cultivo *in vitro* apresentam vantagens sobre as de propagação convencionais (Fay 1994; Engelmann 1997; Thorpe & Harry 1997; Kozai *et al.* 1997) em razão da disponibilidade de água, dos nutrientes, do tipo de substrato e das condições livres de patógenos. Contudo, as análises

dos dados das raízes das plântulas podem também explicar o maior crescimento da parte aérea. A presença e o grau de desenvolvimento das raízes são fatores limitantes para o processo de aclimação, já que as plântulas irão depender da capacidade de absorção para sobreviver a essa nova condição.

Tabela 2 — Índice de sobrevivência e crescimento das raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses e submetidas à aclimação por 2 meses.

Table 2 — Survival rate and growth of *Alcantarea imperialis* roots cultivated *in vitro* for 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months and submitted to acclimatization for 2 months.

Período <i>in vitro</i> (meses)	Sobrevivência (%)	Comprimento (%)	Número (%)	Massa fresca (%)	Massa seca (%)
1	100	62,80	46,46	139,12	213,76
2	99	45,98	104,79	226,34	298,42
4	96	112,16	41,70	*	40,19
6	100	27,40	62,04	19,56	58,67
8	100	36,18	52,13	2,31	2,58
10	100	4,59	26,19	*	5,06
12	100	4,40	23,58	9,28	7,17

(*) tende a zero

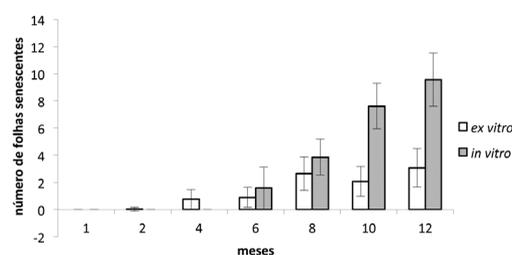


Figura 3 — Número de folhas senescentes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e *ex vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses. Os valores representam a média e as barras indicam o desvio padrão ($n = 50$).
Figure 3 — Number of senescent leaves of *Alcantarea imperialis* cultivated *in vitro* and *ex vitro* for 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months. The values represented the average and the bars indicated the standard deviations ($n = 50$).

A análise dos dados biométricos das raízes mostrou que logo a partir do primeiro mês de cultivo houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros comprimento e acúmulo de massa (Fig. 4a-d). O aumento de ambos ocorreu ao longo do tempo, sendo que as maiores diferenças foram observadas a partir do 6º mês (cerca de cinco vezes maior para as plântulas mantidas *in vitro*), à semelhança do observado para a parte aérea (Figs. 2a e 4a). O crescimento radical das plântulas cultivadas em bandejas não foi tão intenso quanto ao das plântulas mantidas no meio nutritivo *in vitro*. Enquanto que as

plântulas provenientes do tratamento *ex vitro* aumentaram 1,4 vezes em média ao longo do tempo, aquelas do cultivo *in vitro* duplicaram o crescimento radical a cada dois meses em média, sendo que ao comparar-se o comprimento de raízes de plântulas com 4 meses com aquelas de 6 meses, observou-se um aumento em até três vezes no comprimento radical (Fig. 4a). A mesma tendência foi observada para o número de raízes, com aumento de duas vezes (Fig. 4a). O número de raízes (Fig. 4b) nas plântulas cultivadas *in vitro* teve um aumento mais expressivo a partir do 6º mês de cultivo, sendo que as plântulas do cultivo *in vitro* apresentaram o dobro do número de raízes das plântulas com a mesma idade e cultivadas em condições *ex vitro*. Nas plântulas com 12 meses *in vitro* o número médio de raízes foi três vezes maior ao das plântulas com a mesma idade cultivada *ex vitro* (Fig. 4b).

Os dados de massa para as raízes, tanto fresca quanto seca (Fig. 4c-d), apresentaram aumento em todos os períodos analisados. As plântulas *ex vitro* apresentaram valores menores de massa fresca das raízes quando comparadas com as plântulas do cultivo *in vitro*, sendo essa diferença mais evidente a partir do 6º mês (Fig. 4c). Os dados de massa seca das raízes das plântulas do cultivo *ex vitro* só foram maiores naquelas com 1 mês de idade. Nos demais períodos, as plântulas do cultivo *in vitro* apresentaram maiores valores de massa seca das raízes (Fig. 4d) que aquelas mantidas *ex vitro*.

Com base nos dados observados neste trabalho foi possível verificar que as plântulas que se desenvolveram nas condições *in vitro* apresentaram maior crescimento, tanto das raízes como da parte aérea, porém não apresentaram modificações morfológicas, já que os valores de número de folhas sadias se mantiveram similares entre os períodos analisados, independente do sistema de cultivo utilizado.

A presença e número de raízes nas plântulas cultivadas *in vitro* pode influenciar no sucesso de aclimação. A intensificação da produção de raízes *in vitro* é frequentemente relacionada ao emprego de reguladores de crescimento como a auxina sintética, o AIB (ácido-indolilbutírico). Porém o uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo tem sido associado ao aparecimento de variações somaclonais (Joyce *et al.* 2003), indesejáveis quando se pretende uma uniformização da produção ou mesmo a manutenção do genótipo original, isento de mutações, visando programas de conservação (Carneiro & Mansur 2004). Alternativamente ao uso dessas substâncias, tem sido demonstrado que o aumento da concentração de carboidratos, mais frequentemente a sacarose, adicionada ao meio de cultura, pode ser um fator determinante no sucesso da aclimação, por

induzir o desenvolvimento do sistema radicular (Sorace *et al.* 2008). Plantas da orquídea *Oncidium baueri* Lindl., cultivadas *in vitro*, na presença de uma concentração maior de sacarose (40 g l⁻¹) que a de costume (30 g l⁻¹), apresentaram melhor crescimento quando transferidas para cultivo em casa de vegetação. Sorace *et al.* (2008), que trabalharam com essa espécie, associaram o maior desenvolvimento do sistema radicular ao sucesso na aclimação dessa orquídea. Calvete *et al.* (2002) observaram que plantas de *Fragaria* L. (morangueiro) cultivadas *in vitro*, na ausência de sacarose, não apresentavam enraizamento e que a concentração de 45 g l⁻¹ foi a mais favorável ao aparecimento de raízes.

A avaliação das plântulas advindas do cultivo *in vitro*, durante a etapa de aclimação (Fig. 1g), mostrou que o índice de sobrevivência após dois meses foi de aproximadamente 90% para todos os períodos de tempo analisados (Tab. 1). Não foram observadas variações morfológicas ou alterações na pigmentação das folhas de todas as plântulas aclimatadas, além disso, independente do tempo de cultivo *in vitro* as plântulas apresentaram crescimento da parte aérea e das raízes quando cultivadas *ex vitro* (Tabs. 1 e 2). Entretanto, o crescimento foi mais

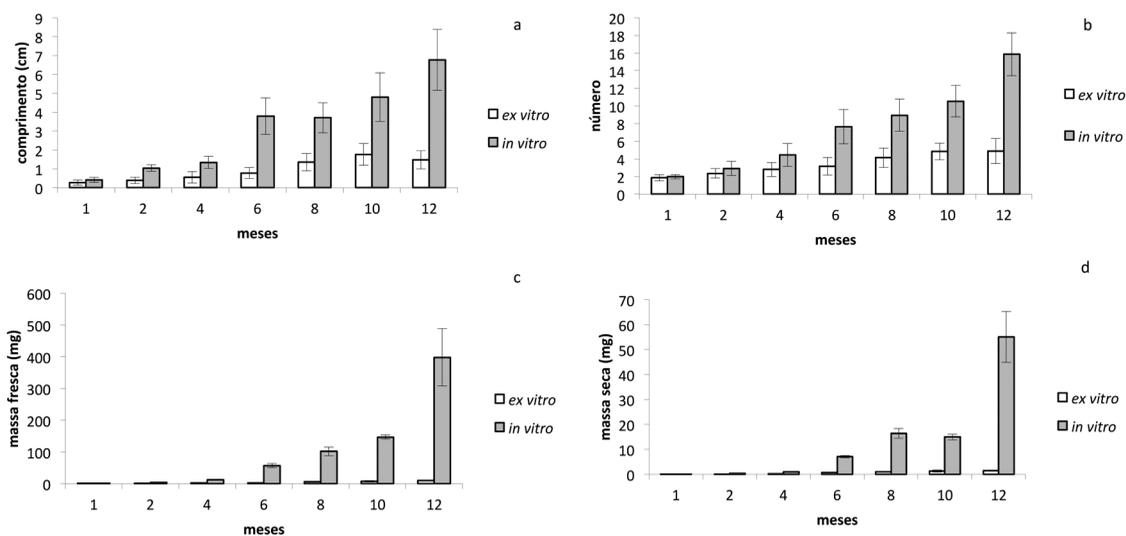


Figura 4 — Crescimento das raízes de plantas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* e *ex vitro* por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses — a. comprimento (cm); b. número; c. massa fresca (mg); d. massa seca (mg). Os valores representam a média e as barras indicam o desvio padrão ($n = 50$).

Figure 4 — Root growth of *Alcantarea imperialis* cultivated *in vitro* and *ex vitro* for 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months — a. length (cm); b. number; c. fresh mass (mg); d. dry mass (mg). The values represented the average and the bars indicated the standard deviations ($n = 50$).

intenso nas plântulas mantidas por 2 meses nas condições *in vitro*, tanto das raízes como da parte aérea. As plântulas aclimatadas após esse período de cultivo *in vitro* apresentaram cerca de 500% de aumento nos valores de massa, fresca e seca, da parte aérea, além de 145% de incremento nos valores para o comprimento das folhas; contudo, para os dados de número de folhas o aumento foi de apenas 80% (Tab. 1).

Os dados de massa, fresca e seca, das raízes e da parte aérea aumentaram em todos os períodos após a aclimação, indicando que mesmo com a senescência de algumas folhas, ocorreu o aumento da biomassa das plântulas. Os dados indicam que o incremento nos valores de massa ocorreu devido ao aumento no comprimento das folhas e não do número delas. Os resultados que mostram o crescimento de plântulas aclimatadas após quatro meses de cultivo *in vitro* indicam que o ganho de massa foi diminuindo em relação àquelas mantidas por menos tempo nos frascos, tanto para a parte aérea como para as raízes (Tabs. 1 e 2).

Em comparação com outros trabalhos sobre o cultivo *in vitro* de bromélias foi possível verificar que o tempo de permanência nas condições *in vitro* varia muito entre as espécies, podendo ser de 2 a 13 meses (Droste *et al.* 2005; Alves *et al.* 2006; Silva *et al.* 2007). Porém, em todos os trabalhos citados anteriormente o objetivo não foi avaliar o menor tempo de cultivo *in vitro* que propiciasse o desenvolvimento satisfatório das plântulas quando aclimatadas, conforme mostrado neste trabalho para a bromélia-imperial.

Conforme mencionado anteriormente, o tempo necessário para a aclimação pode diferir conforme a espécie de bromélia, variando de 4 a 6 meses (Pickens *et al.* 2003; Pompelli & Guerra 2005; Silveira *et al.* 2009). Porém o período utilizado com maior frequência foi o de 2 meses citado, para várias espécies (Arrabal *et al.* 2002; Rech Filho *et al.* 2005; Alves *et al.* 2006; Rech Filho *et al.* 2009), o que corrobora os resultados observados no presente trabalho para *A. imperialis*. Vale ressaltar que dentre os períodos analisados, a aclimação de plântulas mantidas *in vitro* por 2, 4 e 6 meses apresentaram melhor crescimento em comparação àquelas aclimatadas após terem sido cultivadas por mais tempo *in vitro*, recomendando-se, portanto, que as plantas dessa espécie sejam mantidas por no máximo 6 meses na condição *in vitro* antes de serem submetidas à aclimação.

O cultivo *in vitro* se mostrou, assim, eficiente e pode otimizar a produção da bromélia-imperial, constatando-se que plântulas com apenas 2 meses de cultivo *in vitro* já podem ser aclimatadas, contribuindo para uma diminuição no tempo de cultivo e na importante relação custo-benefício para sua produção comercial.

Referências

- Alves, G.M.; Vesco, L.L.D. & Guerra, M.P. 2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae* 110: 204-207.
- Aranda-Peres, A.N. & Martinelli, A.P. 2009. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. *HortScience* 44: 106-112.
- Arrabal, R.; Amancio, F.; Carneiro, L.A.; Neves, L.J. & Mansur, E. 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation* 11: 1081-1089.
- Barbará, T.; Martinelli, G.; Fay, M.F.; Mayo, S.J. & Lexer, C. 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16: 1981-1992.
- Barbará, T.; Lexer, C.; Martinelli, G.; Mayo, S.; Fay, M.F. & Heuertz, M. 2008. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). *Heredity* 101: 285-296.
- Barbará, T.; Martinelli, G.; Palma-Silva, C.; Fay, M.F.; Mayo, S. & Lexer, C. 2009. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65-77.
- Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones, R. 2002. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville. 1377p.
- Calvete, E.O.; Kämpf, A.N. & Suzin, M. 2002. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. *Horticultura Brasileira* 20: 186-191.
- Carneiro, L.A. & Mansur, E. 2004. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. *Vidalia* 2: 12-20.

- Debergh, P.C. 1994. *In vitro* culture of ornamentals. In: Vasil, I.K. & Thorpe, T.A. (eds.). Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 561-573.
- Debergh, P.C. & Maene, L.J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14: 335-345.
- Dias, L.A.S. & Barros, W.S. 2009. Biometria experimental. Suprema, Viçosa. 408p.
- Droste, A.; Silva, A.M.; Matos, A.V. & Almeida, J.W. 2005. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 717-722.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- Engelmann, F. 1997. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. *Acta Horticulturae* 447: 471-475.
- Fay, M.F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3: 176-183.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davies Jr., F.T. & Geneve, R.L. 2002. Plant propagation: principles and practices. 7 ed. Upper Saddle River, New Jersey. 770p.
- Joyce, S.M.; Cassells, A.C. & Jain, M. 2003. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 103-121.
- Kozai, T. 1991. Photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 27: 47-51.
- Kozai, T.; Kubota, C. & Jeong, B.R. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 49-56.
- Martinelli, G. 1997. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: Lima, H.C. & Guedes-Bruni, R.R. (eds.). Serra de Macaé de Cima: diversidade florística e conservação em Mata Atlântica. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 213-250.
- Melo, T.B. 1996. As bromélias no paisagismo. *Bromélia* 3: 3-7.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B. 1995. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana* 16: 147-149.
- Mercier, H. & Nievola, C.C. 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* 1: 57-62.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. 2008. Instrução normativa no. 6, de 23 de setembro de 2008.
- Monteiro, R.F. & Forzza, R.C. 2008. A família Bromeliaceae no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 26: 7-33.
- Moritz, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51: 238-254.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Pedroso, A.N.V.; Lazarini, R.A.M.; Tamaki, V. & Nievola, C.C. 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 407-414.
- Pence, V. 2011. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *Kew Bulletin* 65: 539-547.
- Pickens, K.A.; Affolter, J.M. & Wetzstein, H.Y. 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii in vitro*. *HortScience* 38: 101-104.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 344p.
- Pompelli, M.F. & Guerra, M.P. 2005. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5: 117-126.
- Rech Filho, A.; Vesco, L.L.D.; Nodari, R.O.; Lischka, R.W.; Muller, C.V. & Guerra, M.P. 2005. 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* 14: 1799-1808.
- Rech Filho, A.; Vesco, L.L.D. & Guerra, M.P. 2009. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic forest. *Ciência Rural* 39: 909-912.
- Reuther, G. 1988. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *in vitro* and greenhouse conditions. *Acta Horticulturae* 226: 91-98.
- Sarasan, V.A.; Cripps, R.; Ramsay, M.M.; Atherton, C.; McMichen, M.; Prendergast, G. & Rowntree, J.K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42: 206-214.
- Silva, A.L.L.; Dornelles, E.B.; Bisognin, D.A.; Franco, E.T.H. & Horbach, M.A. 2007. Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral – an extinction threatened bromeliad. *Iheringia, Série Botânica* 62: 39-43.
- Silveira, D.G.; Souza, F.V.D.; Pelacani, C.R.; Souza, A.S.; Ledo, C.A.S. & Santana, J.R.F. 2009.

- Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 923-932.
- Sorace, M.; Faria, R. T.; Damasceno Júnior, C.V.; Gomes, G.P.; Barbosa, C.M.; Vieira, F.G.N.; Silva, G.L.; Takahashi, L.S. A. & Schnitzer, J. A. 2008. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orquidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. *Semina: Ciências Agrárias* 29: 775-782.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2009. *Fisiologia vegetal*. 4th ed. Arned, Porto Alegre. 820p.
- Thorpe, T.A. & Harry, I.S. 1997. Application of tissue culture to horticulture. *Acta Horticulturae* 447: 39-49.
- Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. 1998. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Vols. I e II. EMBRAPA, Brasília. 864p.
- Stockwell, C.A.; Hendry, A.P. & Kinnison, M.T. 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 94-101.
- Versieux, L.M. 2009. *Sistemática, filogenia e morfologia de Alcantarea (Bromeliaceae)*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 252p.
- Versieux, L.M.; Elbl, P.M.; Wanderley, M.G.L. & Menezes, N.L. 2010. *Alcantarea (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications*. *Nordic Journal of Botany* 28: 385-397.
- Versieux, L.M. & Wanderley, M.G.L. 2009. A new species of *Alcantarea (Bromeliaceae, Tillandsioideae)* from Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brazil. *Brittonia* 61: 336-340.