



CALOGÊNESE *in vitro* DE *Bromelia pinguin* L. SOB EFEITO DOS FITORREGULADORES ANA E BAP

Marlon Anderson Marcondes¹; Daniel Pereira Miranda²; Isane Vera Karsburg³; João Aguilar Massaroto³; Norberto Gomes Ribeiro Júnior⁴.

1. Graduado em Agronomia da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta - MT, Brasil.
2. Graduando em Agronomia da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta - MT, Brasil.
(danielmiranda08@hotmail.com)
3. Professor (a) Adjunto (a) da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta - MT, Brasil.
4. Mestrando no Programa de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, *Campus* de Alta Floresta - MT, Brasil.

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

A *Bromelia pinguin* L. é uma espécie ainda pouco explorada economicamente e destaca-se pelo potencial ornamental e pelas suas propriedades medicinais. As plantas propagadas *in vitro* possibilitam uma elevada produção de mudas com características desejáveis e com qualidade fitossanitária em curto espaço de tempo. Objetivou-se estabelecer um protocolo para a calogênese *in vitro* de *Bromelia pinguin* L. As gemas do rizoma foram inoculadas em meio MS contendo reguladores de crescimento, com 10 tratamentos constituídos de cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹) combinadas com duas concentrações de ANA (0; 0,5 mg L⁻¹) com cinco repetições, e cada parcela experimental foi representada por um frasco contendo 3 gemas. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado (DIC). Após período de 90 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: calos, meristema radicular e peso dos calos. Baixas concentrações 0,5 mg L⁻¹ de ANA no meio de cultivo é favorável para a formação de calos *in vitro* para a *Bromelia pinguin*. A adição somente de BAP em meio MS mostrou-se um fator limitante no desenvolvimento dos calos de *Bromelia pinguin*. A maior formação de calos foi obtida na interação de ANA e BAP (ANA (0,5) + BAP (5,0)).

PALAVRAS-CHAVE: Bromeliaceae, calos, gravatá, medicinal

CALLUS FORMATION *in vitro* *Bromelia pinguin* L GROWTH REGULATORS BAP AND NAA

ABSTRACT

The *Bromelia pinguin* L. is a species poorly economically exploited and is characterized by ornamental potential and for its medicinal properties. Plants grown *in vitro* allow a high production of trees with desirable characteristics and health status in a short time. Aimed to establish a protocol for *in vitro* *Bromelia pinguin* L. Gems rhizome multiplication were inoculated on MS medium containing growth

regulators, with 10 treatments consisting of five concentrations of BAP (0, 0.5, 1.0; 2.0 and 5.0 mg L⁻¹) combined with two concentrations of ANA (0, 0.5 mg L⁻¹) with five replications and each plot was represented by a vial containing 3 gems. The experimental design was completely randomized (CRD). Callus, root meristem and callus weight: After 90 days the following parameters were evaluated. Low concentrations 0.5 mg L⁻¹ ANA in the culture medium is favorable for the formation of callus *in vitro* for *Bromelia pinguin*. The only addition of BAP in MS medium proved to be a limiting factor in the development of calluses *Bromelia pinguin*. The highest callus formation was obtained in the interaction of NAA and BAP (ANA (0.5) + BAP (5.0))

.**KEYWORDS:** Bromeliaceae, gravatá, medicinal, callus

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é constituída por aproximadamente 60 gêneros e 6000 espécies (CARVALHO & BERG, 2007). Entre os gêneros que compõem esta família, o mais importante em termos econômicos é o *Ananas*, ao qual pertence o abacaxizeiro utilizado para o consumo *in natura* e industrializado (ALBERT, 2004).

As bromélias vêm cada dia mais, ocupando espaço no paisagismo, graças ao grande potencial ornamental de suas espécies. Dependendo do porte, as bromélias são utilizadas como forrações, conjuntos de caraguatás alinhados no paisagismo de jardins e parques, com o objetivo de formar cercas vivas (CEAP, 2011).

A *Bromelia pinguin* L. que popularmente é chamada de gravatá, caraguatá, caroatá e bananinha do mato, tem ocorrência no Cerrado e em todo o Brasil, tendo distribuição ampla a partir do norte do Pantanal, passando pela costa da Mata Atlântica de Santa Catarina, relata MUNIZ (2007). É uma planta perene, ereta e acaule com tamanho de 40 a 90 cm (1-3 pés, rebentões) forma touceiras. Folhas em roseta basal em coriáceas lanceoladas, com margens com espinhos, base vermelha e verde no ápice.

Os frutos desta espécie são comestíveis, ácidos, adstringentes, consumidos ao natural ou em bebidas refrescantes com possibilidades de industrialização. Pode ser boa matéria-prima para a indústria de enlatados. Na América Central, os frutos são usados para fabricar bebidas refrescantes e vinagre (ENCICLOPÉDIA BOTÂNICA, 2011), além de ter propriedades medicinais como: vermífugo, anti-reumático, diurético, abortivo, para tratar coqueluche, escorbuto, diabetes e doenças dos rins. O escapo floral e receptáculo florífero podem ser usados como verduras. As folhas contêm fibras longas, fortes e sedosas, que são usadas em artesanato, cordoaria e como fibras têxteis. Um corante para culinária é extraído de suas sementes (ENCICLOPÉDIA BOTÂNICA, 2011).

Sabendo da importância desta planta, estudos sobre a propagação por meio da cultura de tecidos são imprescindíveis, uma vez que a cultura de tecidos, apesar do alto custo, proporciona a obtenção de milhares de mudas a partir de uma gema em pequeno intervalo de tempo e espaço, livres de pragas e doenças (ALBERT, 2004). AOYAMA et al., (2012) propagou *in vitro* e *ex vitro* a bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) e verificou que para comprimento (cm) de plantas, número, massa fresca (mg) e massa seca (mg) das plantas propagadas *in vitro* foram muito superiores às plantas propagadas por sementes durante 12 meses, porém com 2 meses as plantas *in vitro* já poderiam ser aclimatadas reduzindo assim o tempo de obtenção de mudas.

No cultivo *in vitro*, durante a elaboração do meio de cultura, a adição de fitorreguladores é realizada para suprir as possíveis deficiências dos teores

endógenos de hormônios nos explantes, uma vez que encontram-se isolados das regiões produtoras na planta matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Dentre os reguladores de crescimento, os principais utilizados na cultura *in vitro*, destacam-se as auxinas e as citocininas. As auxinas estimulam a expansão celular induzindo principalmente o enraizamento de segmentos de plantas, por outro lado as citocininas promovem a divisão celular, assim PASQUAL (2004), e são indispensáveis para a quebra da dominância apical e na indução da proliferação de gemas axilares (ALBERT, 2004).

Desta forma, objetivou-se estabelecer o protocolo para a calogênese de *Bromelia pinguin* L. por meio de gemas.

MATERIAL E METODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da UNEMAT do *Campus* de Alta Floresta. Foram utilizadas gemas apicais de *Bromelia pinguin* L. obtidas em uma propriedade nas margens da rodovia MT-208, nas coordenadas geográficas (latitude 9°53'13.13" S, longitude 56°09'28.82" W), com a distância de 9 quilômetros e 85 metros da saída da cidade de Alta Floresta/MT. As folhas e as raízes foram retiradas e o rizoma contendo as gemas foi lavado em água e submetido à assepsia com álcool 70% por 3 minutos e, em seguida, a hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos.

Em seguida, na câmara de fluxo laminar, foram lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. Após este processo, as gemas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio MS ½ (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7± 0,1. O meio de cultivo foi previamente autoclavado a 121 °C e 1,5 atm durante 20 minutos.

Estes meios de cultivo foram acondicionados em erlenmeyers com capacidade de 1L, identificados e fechados com papel jornal dobrado amarrado com barbante. Os meios de cultura e os frascos com capacidade para 100 mL foram autoclavados durante 20 minutos a 121 °C e 1,5 atm. Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, os meios de cultura foram distribuídos em proporções de 30 mL nos frascos identificados.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x5, constituídos de cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹) combinadas com duas concentrações de ANA (0; 0,5 mg L⁻¹) com cinco repetições, e cada parcela experimental foi representada por um frasco contendo 3 gemas. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com luminosidade em torno de 35 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 26± 1°C e fotoperíodo de 16 horas durante 90 dias.

Após este período foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento dos calos, prolongamentos de gemas, presença de meristema radicular e massa fresca dos calos. A ocorrência de calos, prolongamento de gemas e meristema radicular foi submetido à estatística descritiva. Os dados de massa fresca dos calos foram submetidos à análise de variância pelo software SISVAR - Sistema de Análise de Variância de Dados Balanceados (FERREIRA, 2011) a 5 % de significância e as médias por meio do teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os valores foram transformados em (Y + 0,5) apenas para adequar o coeficiente de variação à análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 90 dias de desenvolvimento das gemas de *Bromelia pinguin*, foi observado que no tratamento controle (ANA (0) + BAP (0)) e com ANA (0) + BAP (1) e ANA (0) + BAP (5), ocorreu maior número de calos formados nos tratamentos com somente um regulador (Figura 1). Esta formação de calos pode ter ocorrido devido ao meio de cultura nutritivo que favoreceu este desenvolvimento. Já FLORES et al., (2006), observaram que no cultivo de *P. tuberosa* não houve formação de calos quando cultivados em meio MS isentos de ANA. As auxinas estimulam a expansão celular e são utilizadas principalmente para induzir o enraizamento de segmentos de plantas (PASQUAL, 2004).

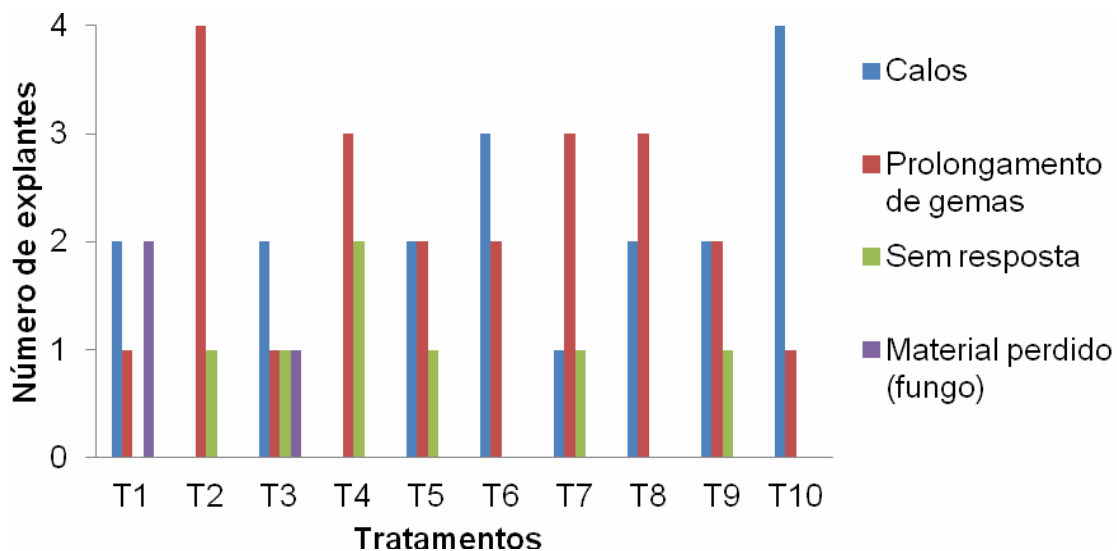


FIGURA 1. Efeito de diferentes combinações de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a matéria fresca de calos friáveis formados em explantes foliares de *Bromelia pinguin*. Legenda: T1 = ANA (0) + BAP (0); T2 = ANA (0) + BAP (0,5); T3 = ANA (0) + BAP (1,0); T4 = ANA (0) + BAP (2,0); T5 = ANA (0) + BAP (5,0); T6 = ANA (0,5) + BAP (0); T7 = ANA (0,5) + BAP (0,5); T8 = ANA (0,5) + BAP (1,0); T9 = ANA (0,5) + BAP (2,0); T10 = ANA (0,5) + BAP (5,0).

Nos meios de cultura contendo somente BAP, o aumento da concentração deste fitorregulador não aumentou o número de calos (Figura 1). Da mesma forma no trabalho de FARIA (2011), não houve formação de calos em *Aechmea ramosa* nos meios de cultura com apenas 2 µM de BAP e no tratamento com 2 µM de ANA.

No tratamento com ausência dos reguladores de crescimento (ANA e BAP) o desenvolvimento de prolongamento de gema foi observado em uma repetição e duas repetições desenvolveram calos, ambos com bom crescimento celular.

Com as concentrações ANA (0) + BAP (0,5) e ANA (0) + BAP (2) somente houve o prolongamento de gema, caracterizada pela divisão das células. Diferente dos tratamentos com dois reguladores, onde todas as concentrações obtiveram o desenvolvimento de calos. FLORES et al., (2007), relata que ficou evidente o efeito negativo do BAP no desenvolvimento de brotos axilares e na regeneração de raízes e calos de *P. tuberosa*.

No tratamento ANA (0) + BAP (5) e ANA (0,5) + BAP (0), ocorreram os mesmo números de prolongamentos foliares porém o maior número de calos foram observados no tratamento ANA (0,5) + BAP (0). Dados de RUBIN et al., (2007), apresentaram melhores resultados com 0,5 mg L⁻¹ de ANA sem a adição de BAP. Pode-se dizer que a auxina (ANA) afeta positivamente a formação de calos.

Observou-se no tratamento ANA (0,5) + BAP (0,5) que somente uma repetição desenvolveu calos, sendo inferior quando comparado com o tratamento ANA (0,5) + BAP (0) no qual obteve três repetições que apresentaram formação de calos somente na adição do regulador ANA (Figura 1). Observou-se que em concentrações igualadas, o regulador BAP prejudica a formação de calos. Conforme MACHADO et al., (2010), fatores como o balanceamento entre os reguladores de crescimento ANA e BAP podem influenciar diretamente a formação dos calos, parte aérea e radicular, de acordo com o balanço dos mesmos no meio de cultura, além de impedir o desenvolvimento pode até mesmo levar o explante a morte.

Os tratamentos ANA (0,5) + BAP (1) e ANA (0,5) + BAP (2) apresentaram duas repetições com desenvolvimento de calos se igualando com os tratamentos ANA (0) + BAP (0); ANA (0) + BAP (1) e ANA (0) + BAP (5) em número de repetições com formação de calos, mostrando que a interação dos reguladores nessas concentrações não afetou na formação de calos. FLORES et al. (2007), afirma que as auxinas são muito utilizadas para promover o crescimento de calos, porém as citocininas também desempenham um papel importante na calogênese.

O tratamento ANA (0,5) + BAP (5) apresentou maior número de calos formados, quatro entre todos os tratamentos (Figura 1), quando comparado com o tratamento ANA (0,5) + BAP (0), o mesmo apresentou três calos desenvolvidos; nota-se que o BAP atuou como inibidor de crescimento e que o ANA mesmo em baixa concentração influenciou diretamente na formação de calos, contudo a interação dos reguladores foi aquela que obteve melhor formação de calos. DIAS et al., (2011), verificaram que o aumento da concentração promoveu decréscimo do comprimento até a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de ANA para o *Ananas comosus*. HANSEN (2009), verificou que na ausência de BAP as concentrações de 1,0 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ de 2,4D proporcionaram maior porcentagem de calos embriogênicos seguidos da interação entre 1,0 mg L⁻¹ BAP e 5,0 mg L⁻¹ ANA para a bromélia *Aechmea fascicata*. Resultados de FLORES et al., (2007), relatam que apenas baixas concentrações de ANA são indicadas para a proliferação de brotos axilares.

Observou-se que não houve diferença significativa de massa fresca entre os tratamentos, isso ocorreu porque não houve interferência dos fitorreguladores no desenvolvimento dos explantes, mas a maior média foi encontrada no tratamento testemunha, com 0,77 mg (Tabela 1), mostrando que o meio nutritivo foi favorável para o desenvolvimento dos explantes. Segundo MACEDO et al., (2003), pequenas concentrações de BAP (1,0 mg L⁻¹), conjugadas com ANA (0,5 mg L⁻¹), proporcionaram maior peso da massa fresca de plântulas de abacaxizeiro. LIMA (2007), obteve a maior média de massa fresca com 2 mg L⁻¹ de BAP e 0,50 mg L⁻¹ de ANA, com subsequente redução da massa fresca, à medida que se diminui a concentração desses reguladores de crescimento.

TABELA 1. Média da matéria fresca dos calos de *Bromelia pinguin* em diferentes concentrações de ANA e BAP. Alta Floresta, MT, 2012.

Tratamentos	Matéria fresca(mg)
ANA(0) + BAP(0)	0,77 a
ANA(0) + BAP(0,5)	0,08 a
ANA(0) + BAP(1,0)	0,08 a
ANA(0) + BAP(2,0)	0,10 a
ANA(0) + BAP(5,0)	0,09 a
ANA(0,5) + BAP(0)	0,09 a
ANA(0,5) + BAP(0,5)	0,11 a
ANA(0,5) + BAP(1,0)	0,12 a
ANA(0,5) + BAP(2,0)	0,13 a
ANA(0,5) + BAP(5,0)	0,10 a
CV (%)	4,27

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Valores transformados em $(Y + 0,5)$.

Constatou-se que o emprego do regulador BAP sem a adição de ANA foi desfavorável na formação de calos, diferindo dos tratamentos mesclados com BAP e ANA que foram favoráveis para o desenvolvimento dos mesmos, com quase o dobro dos tecidos desenvolvidos.

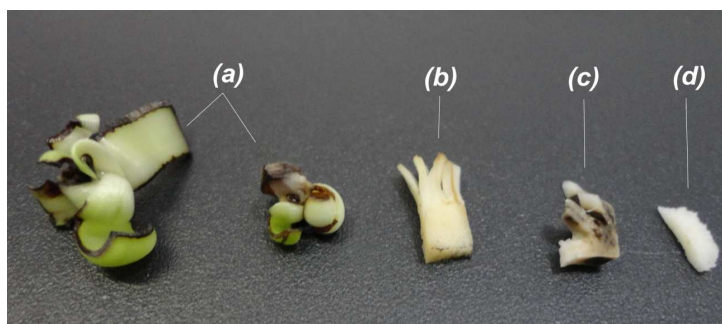


FIGURA 2. Aspecto do desenvolvimento observados em gemas foliares de *Bromelia pinguin*: calos (a), prolongamento de gema (b), prolongamento da gema com oxidação (c), não se desenvolveu (d), após 90 dias de cultivo, Alta Floresta - MT.

CONCLUSÕES

O fitorregulador BAP diminuiu a formação de calos quando não age em conjunto com o fitorregulador ANA, a interação entre os dois fatores foi benéfica, aumentado o aparecimento de calos. A adição de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP em conjunto em meio MS $\frac{1}{2}$, favoreceu a formação de calos em *Bromelia pinguin* L.

REFERÊNCIAS

ALBERT, L.H. de B. **Aspectos morfo-anatomicos de mudas de abacaxizeiro 'Smooth cayenne' micropropagadas**. 2004, 54 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras.

AOYAMA, E. M.; VERSIEUX, L. M.; NIEVOLA, C. C.; VIVEIROS, S. C. M. Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 2, p. 321-331, 2012.

CARVALHO, D.A. de; BERG, E.V.D. **Sistemática vegetal: Pteridófitas, Gimnospermas, Angiospermas**. Lavras: UFLA/ FAEPE, 2007. 160p.

CEAP; **Centro de Estudos Ambientais e Paisagísticos**; Famílias Botânicas /Bromeliaceae. Disponível em: <http://www.ceapdesign.com.br/familias_botanicas/bromeliaceae.html> acesso em 14 outubro 2011.

DIAS, M. M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G.; SANTOS, V. A. dos; Reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár**, Recife, v.6, n.3, p.383-390, 2011.

ENCICLOPÉDIA BOTÂNICA – Bromeliaceae; **Projeto: extrativismo não-madeireiro e desenvolvimento sustentável na Amazônia (ITTO – PD 31/99 Ver. 3 (I))**. Disponível em: <<http://www.ittorolac.org/enciclopedia-botanica/Bromeliaceae>> acesso em 26 outubro 2011.

FARIA, D. V. **Indução *in vitro* de brotos em *Aechmea ramosa var. ramosa Mart ex Schult.F. (Bromeliaceae)***. 2011, 36p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)- Universidade federal do Espírito Santo, Alegre.

FERREIRA, D. S. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.36, n.3, p.845-51, 2006.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T. Efeito do ANA e BAP na calogênese e organogênese de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.4, p.92-96, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI / Embrapa – CNPH, 1998. 864p.

HANSEN, D.S.; COSTA, M. A. P. C.; DANTAS, A. C. V. L.; LEDO, C. A. S.; GARCIA, F. R.; FRANÇA, N. O. **Enbriogênese somática e aclimatização de *Aechmea fascicata***. **Magistra**, Cruz das Almas, v.21, n. 4, p. 284-290, 2009.

LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; BENITEZ, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Influência de fitoreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 669-671, 2007.

MACEDO C. E. C.; SILVA M. G.; NOBREGA F. S.; MARTINS P. M.; BARROSO P. A. V.; ALLOUFA M. A. I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 501-504, 2003.

MACHADO, W.; CARNEIRO, A. A.; COELHO, G. T. da. C. P. Influência de BAP e ANA na formação de calos de *Jatropha curcas* L. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4 & SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1, 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 270-275.

MUNIZ H. J, T. **Colecionando Frutas**; Família das Bromeliaceae, 2007. Disponível em <<http://frutasraras.sites.uol.com.br/bromeliaceae.htm>> acesso em 10 outubro 2011.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol**, v. 15: p. 473-479,1962.

PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 106p.

RUBIN, S.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RIBEIRO, M. V.; BENITZ, L. C.; PETERS J. A.; BRAGA, E. J. B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 480-482, 2007.