

Artigo Original / Original Paper

Armazenamento de sementes colhidas de diferentes posições do escapo floral para obtenção de plantas da bromélia imperial – *Alcantarea imperialis*

Storage of seeds harvested from different positions of the floral scape to obtain imperial bromeliad plants – Alcantarea imperialis

Vivian Tamaki^{1,2,6}, Camila Pereira Carvalho^{1,3}, Rosmari Aparecida de Moraes Lazarini^{1,4}
& Catarina Carvalho Nievola^{1,5}

Resumo

A deiscência não simultânea dos frutos de bromélias deve ser considerada para fins de propagação por sementes. O objetivo deste estudo foi avaliar o melhor método para produção de plantas da bromélia imperial considerando a colheita simultânea das sementes de diferentes posições do escapo floral no período da deiscência dos frutos da base e seu armazenamento para posterior uso na obtenção de plantas. As sementes foram colhidas da base, meio e topo do escapo floral e armazenadas por 26, 61, 154 e 213 dias a 10 °C e a 25 °C. Foram avaliadas a emergência de plantas em gerbox com papel de filtro e a germinação e crescimento *in vitro* com 10, 20 e 30 g.L⁻¹ de sacarose. As sementes colhidas da base e armazenadas por até dois meses a 10 °C foram as que apresentaram maior porcentagem de emergência de plantas (57%) e a melhor concentração de sacarose para germinação *in vitro* foi de 10 g.L⁻¹ e para o crescimento, 20 g.L⁻¹. Considerando-se a vulnerabilidade desta bromélia, o aproveitamento, ao mesmo tempo, das sementes de todo o escapo floral pode ser uma estratégia de conservação.

Palavras-chave: armazenamento, conservação, cultivo *in vitro*, germinação, sacarose.

Abstract

Non-simultaneous dehiscence of bromeliads fruits should be considered for seed propagation purpose. The aim of this work was to evaluate the best method for the production of imperial bromeliad plants considering the simultaneous harvesting of the seeds of different positions of the floral scape in the period of base fruits dehiscence and its storage for later use in the production of plants. Seeds were harvested from the base, middle and top of the floral scape and stored for 26, 61, 154 and 213 days at 10 °C and 25 °C. Plants emergency were evaluated in gerbox with filter paper, and *in vitro* germination and growth with 10, 20 and 30 g.L⁻¹ of sucrose. Seeds harvested from the base and stored for up to two months at 10 °C showed the highest percentage of plants emergence (57%). The best sucrose concentrations for *in vitro* germination was 10 g.L⁻¹ and for plant growth 20 g.L⁻¹. Considering the vulnerability of this bromeliad, the use of the seeds of all the floral scape can be a conservation strategy.

Key words: storage, conservation, *in vitro* cultivation, germination, sucrose.

¹ Instituto de Botânica SMA/SP, Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, São Paulo, SP, Brasil.

² ORCID: <<https://orcid.org/0000-0003-1426-9775>>.

³ ORCID: <<https://orcid.org/0000-0002-6647-2911>>.

⁴ ORCID: <<https://orcid.org/0000-0001-8189-3856>>.

⁵ ORCID: <<https://orcid.org/0000-0003-0627-1357>>.

⁶ Autor para correspondência: vtamaki@gmail.com

Introdução

Bromeliaceae é composta por 58 gêneros e 3.408 espécies (Luther 2014). Muitos membros dessa família possuem elevado valor ornamental devido ao porte e disposição de folhas em grandes rosetas, conferindo a essas bromélias expressiva importância ecológica devido à possibilidade de acumularem água e nutrientes entre suas folhas, que ficam disponíveis para a fauna da região onde vivem (Wanderley & Martins 2007). Entre os membros dessa família se encontra a bromélia imperial, *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, espécie que é considerada a mais utilizada no paisagismo e cuja roseta pode armazenar até 40 litros de água (Versieux & Wanderley 2015). Contudo, essa bromélia encontra-se na categoria “vulnerável a extinção” (MMA 2014) devido principalmente ao extrativismo e perda de populações por queimadas (Versieux & Wanderley 2015). Estudos mais detalhados sobre essa espécie, visando sua propagação para atender ao mercado de ornamentais, podem contribuir para a sua conservação, minimizando a procura por exemplares retirados do ambiente natural (Aoyama *et al.* 2012).

Dentre os métodos de propagação, a obtenção de plantas por meio da germinação de sementes pode contribuir para a manutenção da variabilidade genética, podendo ser aproveitado em programas de repovoamento. Entretanto, segundo Molizane *et al.* (2013), o longo período de florescimento e a maturação desuniforme dos frutos das bromélias são alguns fatores que devem ser considerados na colheita das sementes para fins de propagação.

No caso da bromélia imperial, a produção de brotos é rara e a reprodução ocorre principalmente pela elevada produção de sementes (Versieux & Wanderley 2015). Segundo esses autores, o ciclo de vida de *A. imperialis* é longo, ou seja, podem ser necessários até 40 anos para que atinja a fase de floração. Além disso, a maturação das sementes é desuniforme ao longo do grande escapo floral, e este pode atingir até três metros de altura, dificultando o acesso aos frutos. Essa espécie floresce de novembro a março e seus frutos deíscentes, que amadurecem no período de junho a agosto, se abrem no sentido base-ápice do escapo floral liberando as sementes que medem entre 6–8 mm (Versieux & Wanderley 2015).

Devido ao grande comprimento do escapo floral, a colheita das sementes da bromélia imperial pode ser facilitada cortando-se este no momento em que os frutos da região da base se abrirem.

Não existe informação se as demais sementes dos frutos fechados do escapo floral poderiam ser aproveitadas. Estudos mostram que é possível obter plantas normais a partir do uso de embriões provenientes de frutos imaturos (Pasqual *et al.* 2002; Pereira *et al.* 2006; Nunes *et al.* 2008). Se for possível obter plantas dos frutos fechados da bromélia imperial, esse procedimento pode ser uma estratégia de aproveitamento das sementes produzidas na única floração que antecede a senescência de cada exemplar, fato que é característico de bromélias.

Critérios têm sido estabelecidos para identificar o melhor período de colheita de sementes de bromélias, como demonstrado em estudo utilizando-se plantas de *Nidularium innocentii* Lem. no qual foram avaliados a coloração externa dos frutos e sementes que indicariam a qualidade das mesmas (Pereira *et al.* 2010). Contudo, essa espécie não possui escapo proeminente e seus frutos estão localizados no interior do tanque, entre a sobreposição de folhas. No caso de *A. imperialis*, não foram encontrados trabalhos que cite critérios indicativos para colheita, visando a produção de mudas vigorosas, com o aproveitamento de todas as sementes no momento de corte do grande escapo floral.

Além de uma eficiente colheita, procedimentos de armazenamento têm sido considerados para obtenção de mudas de bromélias como demonstrado por Pereira *et al.* (2010) para *Nidularium innocentii* cujas sementes tiveram a viabilidade aumentada quando armazenadas a 4 °C. Todavia, esses autores mostraram que essas permaneciam viáveis somente se fossem armazenadas por até 90 dias decorridos da data da colheita. Não foram encontrados estudos que indicassem a porcentagem de germinação de sementes da bromélia imperial após o armazenamento, comparando-se sementes colhidas de todo o escapo floral no momento do corte deste.

Tem sido demonstrado que o cultivo *in vitro* pode acelerar o tempo de germinação das sementes de *A. imperialis*, por isso é considerado um eficiente método de obtenção de plantas dessa espécie quando comparado ao cultivo convencional em sementeiras (Aoyama *et al.* 2012), sendo que o satisfatório desenvolvimento das plantas pode estar associado ao fornecimento de sacarose (Freitas *et al.* 2015), já que a morfogênese e o crescimento são processos que necessitam de energia (Buchanan *et al.* 2015). Embora existam protocolos para a produção de *A. imperialis* (Kurita & Tamaki

2014), não foi relatada a influência da sacarose sobre o processo de obtenção de mudas a partir da germinação de sementes *in vitro*, coletadas de diferentes posições do escapo.

O objetivo deste estudo foi avaliar o melhor método para produção de plantas da bromélia imperial considerando a colheita simultânea das sementes de diferentes posições do escapo floral, além do armazenamento destas e seu uso para obtenção de plantas *in vitro*.

Material e Métodos

Material vegetal e armazenamento das sementes

Foram utilizadas sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms colhidas de três exemplares cultivados na coleção viva de Bromeliaceae do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo. Os três escapos florais coletados apresentavam início da deiscência apenas dos frutos da base, sendo que eles foram divididos em três partes iguais: base, meio e topo (Fig. 1a,b). Foi verificado que as sementes apresentavam tamanhos diferentes de acordo com a região de procedência dos frutos. As sementes dos frutos localizados na base do escapo mediam entre 6,1–10 mm, as do meio 3,1–6 mm e as do topo 1,1–3 mm (Fig. 1c).

As sementes obtidas foram armazenadas em condições controladas de temperatura, a 25 ± 2 °C e 10 ± 2 °C, em câmaras de crescimento, por até 213 dias em embalagens de papel kraft. As massas fresca e seca das sementes e o teor de água foram avaliados logo após a colheita (T_i = tempo inicial) e após 26, 61, 154 e 213 dias de armazenamento, sendo as análises realizadas em triplicatas de 100 sementes.

Germinação de sementes

As sementes obtidas das diferentes posições do escapo floral, tanto as de T_i como aquelas armazenadas por 26, 61, 154 e 213 dias, foram colocadas para germinar em quatro gerbox com papel de filtro umedecido, contendo 25 sementes em cada. O experimento foi mantido sob temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 30 dias da semeadura, período previamente analisado por Araújo *et al.* (2012), determinou-se a porcentagem de emergência de plantas, a qual foi considerada como a emissão da primeira folha.

Baseado em resultados do experimento anterior, foi estabelecido o cultivo *in vitro* a

partir das sementes coletadas das três posições do escapo floral e armazenadas a 10 ± 2 °C por 213 dias. Esta técnica foi escolhida visando otimizar a formação de plantas, pois sabe-se que o cultivo *in vitro* aumenta a porcentagem de germinação de bromélias em cerca de 10 vezes quando comparado com o cultivo convencional em gerbox (Aoyama *et al.* 2012).

As sementes tiveram os apêndices plumosos removidos e foram desinfestadas de acordo com protocolo descrito em Carvalho *et al.* (2013). Foram utilizadas 270 sementes de cada categoria (posição no escapo floral), distribuídas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro (Fig. 1d) contendo 10 mL do meio de cultura Murashige & Skoog (1962) com a concentração de macronutrientes reduzida à metade (MS/2), 5 g.L^{-1} de ágar e suplementada com três concentrações de sacarose: 10, 20 e 30 g.L^{-1} . O pH foi ajustado para 5,8. Essas condições de cultivo *in vitro* foram estabelecidas por Aoyama *et al.* (2012). As placas foram mantidas em sala de cultura com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossinteticamente ativa de $30 \mu\text{m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada tratamento foi composto de nove repetições e utilizadas 30 sementes de cada categoria por repetição. Para determinar a influência da variação de sacarose no meio de cultura na germinação das sementes, foi avaliada a porcentagem de emergência de plantas após 30 dias da semeadura.

Produção de plantas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose

Conforme os resultados de emergência obtidos na análise anterior, foi montado novo experimento visando acompanhar o crescimento das plantas cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose. Plantas com 30 dias *in vitro*, obtidas a partir de sementes da base, foram transferidas para tubos de ensaio de vidro (ca. 25×150 mm) com 5 mL do meio de cultura, mantendo-se a mesma concentração de sacarose nas quais as sementes germinaram. Foram utilizadas 40 plantas (uma por tubo de ensaio) para cada concentração de sacarose, sendo mantidas em sala de cultura com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossinteticamente ativa de $30 \mu\text{m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por quatro meses. Após esse período, as plantas foram avaliadas quanto ao número de folhas e raízes, comprimento da parte aérea e raiz, porcentagem de folhas senescentes, massa fresca e seca da raiz e parte aérea e conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Fig. 1e) (Lichtenthaler 1987).

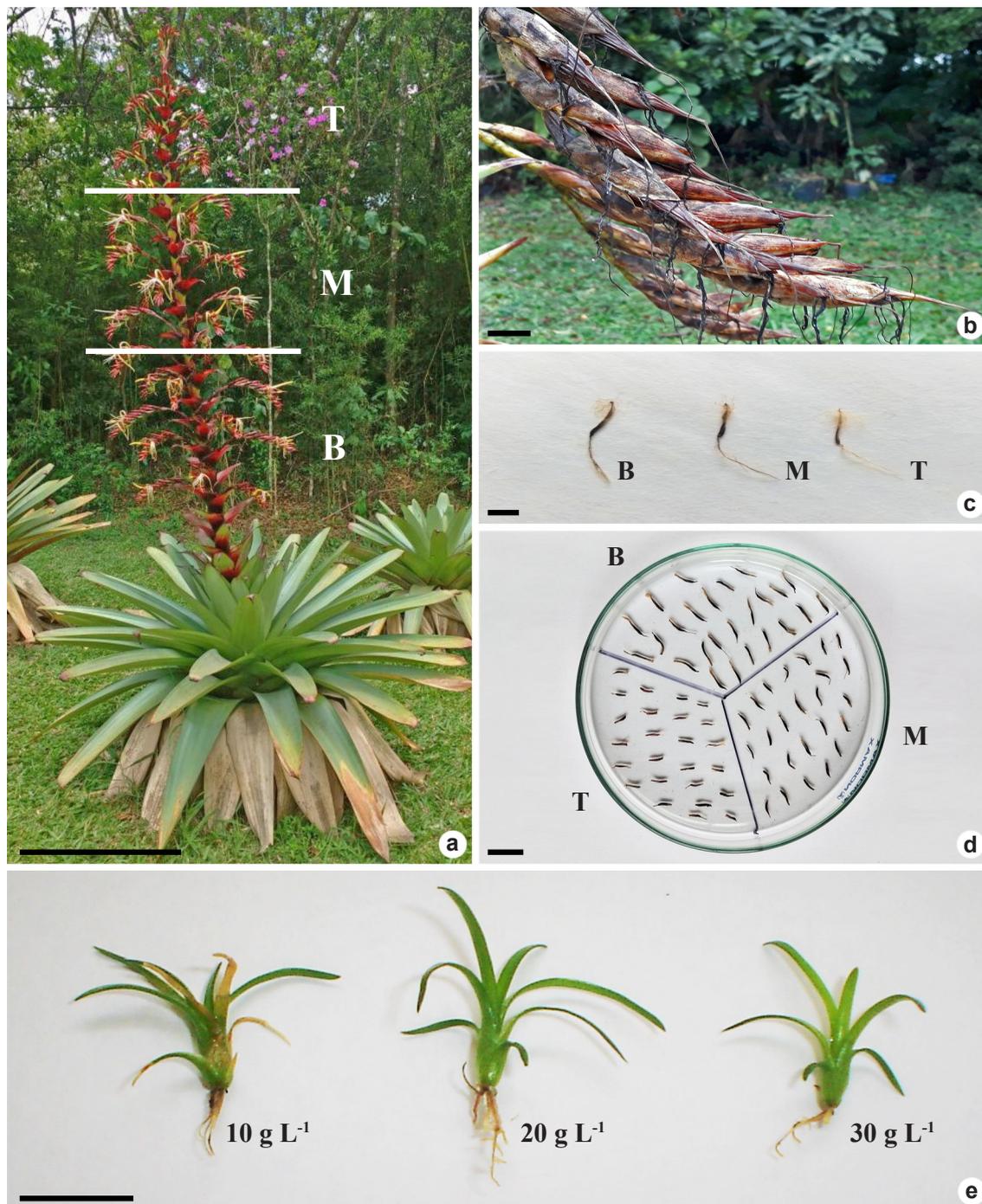


Figura 1 – a-e. *Alcantarea imperialis* – a. indivíduo adulto sinalizado com as regiões de coleta das sementes; b. detalhe dos frutos; c. sementes coletadas das diferentes regiões do escapo floral; d. germinação *in vitro* de sementes obtidas das diferentes regiões do escapo floral; e. plantas crescidas *in vitro* por quatro meses com as concentrações de sacarose de 10 g L^{-1} (notar a presença de folhas senescentes), 20 g L^{-1} e 30 g L^{-1} . B = base; M = meio; T = topo. Barras de escala: a = 50 cm; b,d,e = 1 cm; c = 0,5 cm.

Figure 1 – a-e. *Alcantarea imperialis* – a. adult plant signaled with seeds collection regions; b. detail of the fruits; c. seeds collected from different regions of the floral scape; d. *in vitro* germination of seeds obtained from different regions of the floral scape; e. plants grown *in vitro* for four months with sucrose concentrations of 10 g L^{-1} (note the presence of senescent leaves), 20 g L^{-1} and 30 g L^{-1} . B = base; M = middle; T = top. Scale Bars: a = 50 cm; b,d,e = 1 cm; c = 0,5 cm.

Análise estatística

O delineamento utilizado em todos os experimentos foi inteiramente casualizado. As médias dos valores obtidos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Este estudo verificou que há possibilidade de serem utilizadas as sementes colhidas, simultaneamente, de todo o escapo floral (da base até o topo) de *A. imperialis* na época de deiscência dos frutos localizados na base deste.

Os resultados obtidos mostraram uma redução gradativa no conteúdo de água das sementes mantidas nas duas temperaturas (25 °C e 10 °C) (Tab. 1). Em relação ao Ti, as sementes oriundas da base apresentaram o menor conteúdo hídrico (21%) se comparadas com aquelas do meio (62%) e do topo (63%) (Tab. 1), sugerindo que somente as sementes da base atingiram a maturidade fisiológica. O ponto de maturidade fisiológica está associado a um menor conteúdo hídrico, maior acúmulo de matéria seca, supressão da germinação precoce e aquisição de tolerância a dessecação nas sementes, o que possibilita resistência aos estresses ambientais, como a secagem, permitindo que a espécie sobreviva durante os períodos desfavoráveis para o crescimento da planta (Castro *et al.* 2004). Nas sementes armazenadas a 10 °C, a perda de água foi mais lenta, principalmente nas sementes da base, que eram as maiores. Nestas, foi verificado o dobro do valor de massa fresca em relação às do topo.

Para o armazenamento das sementes de *A. imperialis* deste estudo, utilizou-se uma embalagem de papel kraft, a qual apesar de permitir a troca de vapor entre as sementes e o ambiente externo (Villela & Peres 2004), não causou flutuações no teor hídrico destas em função da variação da umidade relativa do ar (Tab. 1). Esse tipo de embalagem é comumente utilizado no armazenamento de diversas espécies de bromélias, como *Ananas ananassoides* (Baker) L.B. Sm. (Anastácio & Santana 2010), *Nidularium innocentii* (Pereira *et al.* 2010), *Vriesea gigantea* Mart. ex Schult. f. e *Tillandsia pohliana* Mez (Araújo *et al.* 2012).

A massa seca das sementes, colhidas das três posições do escapo floral, praticamente não variou em relação ao Ti, período e temperatura de armazenamento (Tab. 1). De acordo com Lopes

et al. (2005), o ponto de maturidade fisiológica, que também está associado com o maior acúmulo de matéria seca, teoricamente, é o mais indicado para a colheita. Alterações em relação a massa seca de sementes da bromélia *Dyckia goehringii* E. Gross & Rauh mostraram uma maior massa seca entre 30 e 45 dias após a antese, sendo o mesmo período em que a germinação foi mais elevada, demonstrando a relação entre a matéria seca e maturidade fisiológica para estas plantas (Duarte & Carneiro 2009). Em algumas espécies de bromélias, as maiores taxas de germinação coincidem com altos valores de teor hídrico, como demonstrado para *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker e *Puya santosii* Cuatrec. (Molizane *et al.* 2013; Calderón-Hernández & Pérez-Martínez 2018). As sementes recém-colhidas (Ti) de *A. imperialis* avaliadas nesse trabalho também possuíam um elevado teor hídrico, todavia apresentaram as maiores porcentagens de emergência de plantas (ver Fig. 2). Esse resultado corrobora com o relatado por Molizane *et al.* (2013) sobre o ponto de maturidade fisiológica das sementes coincidir com um maior teor de água em algumas espécies do grupo.

Na Tabela 1 observa-se a influência da temperatura e do armazenamento no teor de água e na massa das sementes. Verificou-se que o armazenamento a 10 °C retardou a perda de água nas sementes em relação às armazenadas a 25 °C, pois até o 61^o dia sob 10 °C as sementes da base permaneceram com o mesmo teor de água (cerca de 20%), decaindo em seguida (cerca de 10%), enquanto que naquelas armazenadas a 25 °C o teor de água diminuiu já no 26^o dia, indo de 20% no Ti para 10%. Sabe-se que o aumento da temperatura ambiental causa redução da umidade na semente (Villela & Peres 2004), dessa forma o armazenamento a 10 °C pode ter contribuído para um retardamento na perda de água. Aos 154 dias, as sementes provenientes de todas as posições do escapo floral apresentaram os menores valores, porém semelhantes, para o teor de água independentemente da temperatura de armazenamento, indicando que o período de dois meses é o tempo limite para o melhor aproveitamento das sementes após a colheita. Contudo, a germinação imediata das sementes assim que os frutos entram em deiscência é a mais recomendável (Fig. 2).

A Figura 2 mostra que no Ti as sementes colhidas de frutos da base e do meio apresentaram maiores porcentagens de emergência de plantas (26% da base e 24% do meio) em relação às

Tabela 1 – Massa fresca, massa seca e teor de água em sementes de *Alcantarea imperialis* avaliadas logo após a colheita (Ti = tempo inicial) e armazenamento nas temperaturas de 25 °C e 10 °C por 26, 61, 154 e 213 dias. As sementes foram obtidas da base, meio e topo do escapo floral. As primeiras letras maiúsculas comparam os valores na mesma posição do escapo floral para uma mesma temperatura, as letras minúsculas comparam os valores entre as três posições do escapo floral para uma mesma temperatura durante o mesmo período e as últimas letras maiúsculas comparam os valores obtidos na mesma posição do escapo floral entre as duas temperaturas em um mesmo período pelo teste Tukey a 5%. ($n = 3$).

Table 1 – Fresh and dry mass and water content in seeds of *Alcantarea imperialis* evaluated shortly after harvesting (Ti = initial time) and storage at temperatures of 25 °C and 10 °C for 26, 61, 154 and 213 days. The seeds were obtained from the base, middle and top of the floral scape. The first uppercase letters compare values in the same position of the floral scape for a same temperature, the lowercase letters compare values between the three positions of the floral scape for the same temperature during the same period and the last uppercase letters compare values obtained in the same position of the floral scape between the two temperatures in the same period by the Tukey test at 5%. ($n = 3$).

Tempo (dias)	Posição no escapo floral	Temperatura de armazenamento (°C)	Teor de água (%)	Massa fresca (g.100 sementes ⁻¹)	Massa seca (g.100 sementes ⁻¹)
Ti	Base	-	21 AbA	0,35 AaA	0,13 AaA
	Meio	-	62 AaA	0,28 AbA	0,11 AbA
	Topo	-	63 AaA	0,17 AcA	0,13 ABaA
26	Base	25	10 BaB	0,15 BaB	0,12 ABaB
		10	19 AbA	0,21 BaA	0,13 AaA
	Meio	25	13 BaB	0,13 BaB	0,11 AaA
		10	34 BabA	0,18 BaA	0,12 AaA
	Topo	25	11 BaB	0,14 BaB	0,13 AaA
		10	38 BaA	0,16 BaA	0,13 ABaA
61	Base	25	12 BaB	0,13 BaB	0,12 BaB
		10	21 AaA	0,18 BCaA	0,14 AaA
	Meio	25	13 BaB	0,14 BaB	0,12 AaA
		10	25 BaA	0,16 BaA	0,12 AbA
	Topo	25	12 BaB	0,13 BaB	0,11 BaB
		10	26 BCaA	0,17 AaA	0,14 AaA
154	Base	25	12 BaA	0,15 AaA	0,13 AaA
		10	10 BaA	0,15 BaA	0,14 AaA
	Meio	25	12 BaA	0,13 BaA	0,12 AabA
		10	10 CaA	0,13 CaA	0,12 AbA
	Topo	25	12 BaA	0,11 CaA	0,10 BbA
		10	10 CaA	0,13 CaA	0,12 BbA
213	Base	25	14 BaA	0,15 AaA	0,13 AaA
		10	12 BaA	0,15 BaA	0,13 AaA
	Meio	25	14 BaA	0,14 BaA	0,12 AbA
		10	12 CaA	0,13 CaA	0,12 AbA
	Topo	25	0,0000 *	0,0000 *	0,0000 *
		10	0,0000 *	0,0000 *	0,0000 *

- Sementes que não foram armazenadas. *Dados não avaliados devido ao material insuficiente.

sementes do topo (5% de plantas formadas). Quando mantidas a 25 °C por até 213 dias, a porcentagem de emergência de plantas a partir das sementes colhidas das três posições do escapo floral decaiu gradativamente, chegando próximas a 5% das sementes obtidas da base e do meio (Fig. 2a). As sementes da base mantidas a 10 °C, aos 213 dias, exibiram uma maior porcentagem de emergência de plantas do que as que permaneceram em 25 °C (Fig. 2b). Esses resultados podem estar relacionados à velocidade na perda de água das sementes (Tab. 1) em função do tamanho delas. A perda de água foi maior nas sementes originadas do meio e do topo em ambas as temperaturas de armazenamento, indicando um estado imaturo das mesmas. Ademais, o aumento no tempo de armazenamento de sementes imaturas pode levar a menores taxas de germinação (Castro *et al.* 2004), como foi demonstrado por este estudo com as sementes do topo.

A baixa temperatura influencia na atividade respiratória da semente e dos microrganismos presentes, além de conservar os componentes celulares e permitir a disponibilização das reservas (Villega & Peres 2004). Uma avaliação pontual, aos 61 dias, em sementes provenientes da mesma posição do escapo floral nas duas temperaturas utilizadas neste estudo, não revelou diferenças significativas quanto à porcentagem de emergência de plantas (dados não mostrados), apesar dos resultados indicarem uma tendência de que a temperatura de 10 °C seja mais favorável ao armazenamento das sementes desta bromélia (Fig. 2). O armazenamento em temperaturas maiores pode promover a deterioração das sementes devido à aceleração do seu metabolismo, por isso para muitas espécies o armazenamento em baixas temperaturas é recomendado (Villega & Peres 2004; Demito & Afonso 2009). Desse modo, sugere-se que as sementes de *A. imperialis* sejam armazenadas a 10 °C a fim de aumentar sua longevidade, principalmente caso não seja possível a germinação imediata das sementes.

Para a bromélia *Nidularium innocentii*, as sementes armazenadas a 4 °C apresentaram maior germinação em comparação com aquelas mantidas a 18 °C, mas ambas as taxas decaíram conforme se prolongava o armazenamento, independente da temperatura (Pereira *et al.* 2010), resultado semelhante ao apresentado neste estudo. Entretanto, as sementes da bromélia *Puya raimondii* Harms armazenadas a 11 °C mostraram um menor teor hídrico e uma maior

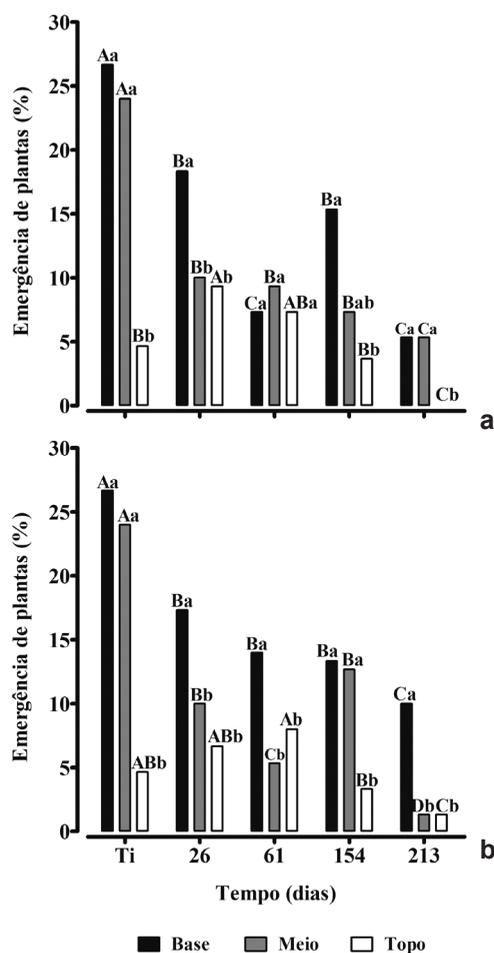


Figura 2 – Porcentagem de emergência de plantas de *Alcantarea imperialis* a partir de sementes obtidas da base (barras pretas), meio (barras cinzas) e topo (barras brancas) do escapo floral. A porcentagem de plantas formadas foi determinada após 30 dias de semeadura em seguida da coleta de sementes (Ti = tempo inicial) e após armazenamento (a. na temperatura de 25 °C; b. na temperatura de 10 °C) por 26, 61, 154 e 213 dias. Letras maiúsculas comparam os valores de plantas formadas a partir de sementes obtidas da mesma posição do escapo floral ao longo do período de armazenamento e letras minúsculas comparam os valores de plantas formadas a partir de sementes obtidas das três posições do escapo floral dentro do mesmo período de armazenamento pelo teste Tukey a 5% ($n = 3$).

Figure 2 – Plants emergency of *Alcantarea imperialis* from seeds obtained from base (black bars), middle (gray bars) and top (white bars) of floral scape. The percentage of plants formed was determined after 30 days of sowing after seed collection (Ti = initial time) and after storage (a. at 25 °C; b. at 10 °C) for 26, 61, 154 and 213 days. Uppercase letters compare values of plants formed from seeds obtained from the same position of the floral scape over the storage period and lowercase letters compare values of plants formed from seeds obtained from the three positions of the floral scape within the same period of storage by the Tukey test at 5% ($n = 3$).

viabilidade em relação as sementes armazenadas a 21 °C (Vadillo *et al.* 2004). Ademais, deve-se considerar que temperaturas baixas não aceleraram o metabolismo da semente, reduzindo o consumo de suas reservas. Essa variação nos resultados dentre espécies demonstra a importância da avaliação da temperatura de armazenamento e do teor hídrico para a manutenção da viabilidade nas sementes de Bromeliaceae.

Após o armazenamento a 10 °C por 213 dias, foi realizado o cultivo *in vitro* das sementes de *A. imperialis* em meio nutritivo com diferentes concentrações de sacarose. Essa técnica favoreceu a germinação dessa espécie, pois verificou-se o dobro da emergência de plantas em comparação às sementes de Ti germinadas em gerbox (57% e 26%, respectivamente). Esse aumento ocorreu apenas para as sementes da base em meio nutritivo contendo 10 g.L⁻¹ de sacarose. Entretanto, em concentrações maiores desse carboidrato, a porcentagem de emergência de plantas diminuiu para 44% com o uso de 20 ou 30 g.L⁻¹. Não foi observada a influência da sacarose sobre a porcentagem de emergência de plantas a partir do uso das sementes do meio e do topo do escapo (0% nas sementes do topo e de 2% a 3% nas sementes da região do meio do escapo). Esse resultado pode estar relacionado com o alto teor hídrico encontrado nas sementes do meio em Ti (62%), sugerindo que estas estariam imaturas e por isso não toleraram a desidratação que ocorreu durante o armazenamento por 213 dias, a qual reduziu seu conteúdo hídrico para 12% (Tab. 1). Conforme relatado anteriormente, o armazenamento de sementes imaturas pode reduzir as taxas germinativas (Castro *et al.* 2004). Em sementes da espécie arbórea *Vochysia divergens* Pohl também foi verificado uma redução no teor hídrico acompanhada de uma queda na germinação no maior tempo de armazenamento (150 dias) (Oliveira *et al.* 2018).

Estudos mostram que a concentração de sacarose pode influenciar na germinação e obtenção de plantas em diferentes espécies, já que um aumento na concentração deste açúcar pode levar a uma redução no potencial osmótico do meio de cultura, resultando em menor disponibilidade de água (Calvete *et al.* 2002). Em sementes da bromélia *Tillandsia eizii* L.B. Sm. a taxa de germinação não apresentou diferença entre aquelas mantidas em meio de cultura sem sacarose ou suplementado com 20 g.L⁻¹ (Pickens *et al.* 2003). Já em sementes da orquídea *Cypripedium macranthos* Sw., a germinação foi favorecida no meio de cultura com

10 g.L⁻¹ em comparação com aqueles em que a sacarose era ausente ou apresentavam uma concentração de 20, 30 ou 40 g.L⁻¹ (Huh *et al.* 2016). Para *A. imperialis*, o acréscimo de sacarose favoreceu a emergência das plantas apenas com o uso de sementes da base, provavelmente devido a estas estarem em seu estado de maturação fisiológica, conforme relatado anteriormente.

Diante da maior quantidade de plantas formadas a partir de sementes provenientes da base em relação às demais, foi realizado o acompanhamento do crescimento *in vitro* dessas plantas mantidas nas três concentrações de sacarose. Após quatro meses de cultivo, as plantas não apresentaram diferenças para a maioria das variáveis analisadas, sendo que apenas o número de raízes foi maior nas plantas cultivadas em 20 g.L⁻¹ de sacarose em relação aos outros tratamentos (Fig. 1e; Tab. 2). Porém, deve-se destacar que a maior porcentagem de folhas senescentes ocorreu nas plantas mantidas em 10 g.L⁻¹ de sacarose (Tab. 2; Fig. 1e), apesar desta quantidade de sacarose ter sido a mais favorável à germinação. Trabalhos com cultivo *in vitro* de diferentes espécies de bromélias relataram o uso de 17 g.L⁻¹ de sacarose para *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra, de 20 g.L⁻¹ para *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch & Otto e de 30 g.L⁻¹ para *Nidularium minutum* Mez e *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal (Carvalho *et al.* 2013; Freitas *et al.* 2015; Andrade & Tamaki 2016; Santos *et al.* 2017; Silva *et al.* 2017). É descrito na literatura que altos níveis de sacarose no meio de cultura podem levar à um menor conteúdo de água disponível para os tecidos vegetais, resultando em alterações na emergência e no crescimento das plantas *in vitro* (George *et al.* 2008; Bhatia *et al.* 2015). Todavia, a ausência de sacarose pode afetar a sobrevivência das plantas, como verificado para o abacaxi ornamental (*Ananas bracteatus* (Lind.) Schult. & Schult. f.), que apresentou sobrevivência de 50% em meio nutritivo sem sacarose e taxas variando de 95 a 100% com a adição deste açúcar, demonstrando a sua importância no meio de cultura (Oliveira *et al.* 2010).

Plantas da bromélia *Vriesea inflata* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose apresentaram um menor desenvolvimento com 30 g.L⁻¹ ou mais deste açúcar, sendo que aquelas cultivadas em menores concentrações apresentaram o maior crescimento radicular *in vitro* e conseqüentemente originaram plantas maiores durante a etapa de aclimatização, que é a transferência de plantas cultivadas *in vitro* para

Tabela 2 – Biometria, massa fresca, massa seca e conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plantas de *Alcantarea imperialis* mantidas *in vitro* por quatro meses em diferentes concentrações de sacarose. Letras distintas na mesma linha indicam que os dados diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. MS = massa seca. ($n = 15$).

Table 2 – Growth parameters, fresh and dry mass and photosynthetic pigment content in *Alcantarea imperialis* plants maintained *in vitro* for four months at different concentrations of sucrose. Different letters on the same line indicate that the data differ from each other by the Tukey test at 5%. MS = dry mass. ($n = 15$).

	Concentração de sacarose (g.L ⁻¹)		
	10	20	30
Raiz			
Número	3,13 b	4,50 a	3,13 b
Comprimento (cm)	0,50 a	0,69 a	0,59 a
Massa fresca (mg.planta ⁻¹)	0,49 a	1,07 a	0,51 a
Massa seca (mg.planta ⁻¹)	0,11 a	0,19 a	0,20 a
Parte aérea			
Número de folhas	6,88 a	7,00 a	7,13 a
Folhas senescentes (%)	23,64 a	5,36 b	3,51 b
Comprimento (cm)	2,23 a	2,26 a	1,80 a
Massa fresca (mg.planta ⁻¹)	48,40 a	42,84 a	37,84 a
Massa seca (mg.planta ⁻¹)	3,95 a	3,77 a	3,59 a
Clorofila a (mg.g MS ⁻¹)	9,70 a	8,95 a	8,79 a
Clorofila b (mg.g MS ⁻¹)	4,39 a	4,31 a	4,02 a
Carotenoides (mg.g MS ⁻¹)	2,43 a	2,38 a	2,35 a

condições *ex vitro* (Freitas *et al.* 2015). Entretanto, o uso de 30 g.L⁻¹ foi benéfico para a proliferação de calos de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. Smooth Cayenne) induzindo o incremento na massa seca, porém foi reduzido com a adição de 35 e 40 g.L⁻¹ desse carboidrato no meio nutritivo (Samuel *et al.* 2018).

Oliveira *et al.* (2010), ao analisar diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30 g.L⁻¹) durante o cultivo *in vitro* de *Ananas bracteatus*, verificaram um menor conteúdo de clorofila na ausência deste açúcar, sugerindo que a sacarose possa interferir em rotas metabólicas relacionadas com a síntese deste pigmento. Essa resposta foi distinta do observado para *A. imperialis* neste trabalho, que não apresentou alterações nesse parâmetro (Tab. 2). Lembrechts *et al.* (2017) com a bromélia *Guzmania* “Hilda” crescida *in vitro* com 5, 12,5, 25 e 40 g.L⁻¹ de sacarose demonstraram que, durante a etapa de aclimatização, as plantas oriundas dos meios nutritivos com maiores concentrações

deste carboidrato dependem da quebra dos açúcares e amido acumulados em suas folhas para a sua sobrevivência e crescimento. Entretanto, as plantas obtidas dos meios com menores adição de sacarose, e consequentemente menor acúmulo de açúcares e amido nas folhas, tiveram a fotossíntese favorecida, já que esta não é inibida por feedback mediado pelos açúcares.

O presente estudo mostrou como pode ser o aproveitamento simultâneo das sementes presentes ao longo do escapo floral da bromélia imperial, associando ao armazenamento e cultivo inicial das plantas visando a obtenção de mudas. O conteúdo de água das sementes pode ser um parâmetro para indicar a eficiência na obtenção de plantas de *A. imperial* quando se considera o armazenamento destas em diferentes temperaturas. Além disso a deiscência dos frutos da bromélia imperial nem sempre é indicativo de que as demais sementes, daqueles que ainda não se abriram, não possam ser aproveitadas. Contudo, a porcentagem de

obtenção de plantas varia em função do tamanho das sementes, colhidas em diferentes posições do escapo floral. Para a bromélia imperial, em relação ao crescimento *in vitro*, os resultados mostraram que 20 g.L⁻¹ de sacarose foi considerada mais adequada que o uso de 30 g.L⁻¹ para propiciar melhor crescimento das plantas, revelando que nem sempre a maior concentração é a mais indicada.

Em geral, os trabalhos mostram a eficiência da germinação isoladamente do estabelecimento do cultivo *in vitro*. Verificou-se que as sementes da porção basal do escapo, em relação ao armazenamento, são as que germinam melhor em relação às da porção mediana e apical, que apresentam menor rendimento. Adicionalmente, recomenda-se o armazenamento pelo período máximo de dois meses, preferencialmente a 10 °C. Na impossibilidade de se cultivar em gerbox (método menos dispendioso que o cultivo *in vitro*) antes desse período, é possível otimizar a germinação de sementes e crescimento das plantas por meio do uso da técnica do cultivo *in vitro*, utilizando 10 g.L⁻¹ de sacarose no meio nutritivo MS/2 na etapa de germinação e 20 g.L⁻¹ deste açúcar para o crescimento das plantas. Considerando-se o fato da bromélia imperial ser ameaçada de extinção, estando classificada como vulnerável de acordo com a Portaria nº 443/2014 (MMA 2014), e possuir crescimento lento, o aproveitamento máximo das sementes de todo o escapo floral, coletando-os no momento da deiscência dos frutos, pode ser uma estratégia de conservação.

Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o auxílio concedido a C.P. Carvalho. Agradecemos a Ivomar Aparecido Medina e a Sabrina Vanessa de Andrade-Santos, as fotos cedidas.

Referências

- Anastácio MR & Santana DG (2010) Características germinativas de sementes de *Ananas ananassoides* (Baker) L.B. Sm. (Bromeliaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 32: 195-200
- Andrade SV & Tamaki V (2016) *In vitro* growth of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae) in different concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium. *Journal of Plant Nutrition* 39: 1634-1643.
- Aoyama EM, Versieux LM, Nievola CC & Mazzoni-Viveiros SC (2012) Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*. *Rodriguésia* 63: 321-331.
- Araújo NAB, Kurita FMK & Tamaki V (2012) Nutritional reserves in seeds of bromeliad species. *Communications in Plant Sciences* 2: 57-59.
- Bhatia S, Sharma K, Dahiya R & Bera T (2015) Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. Elsevier, London. 452p.
- Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (2015) *Biochemistry & molecular biology of plants*, 2nd ed. Wiley Blackwell, Hoboken. 1264p.
- Calderón-Hernández M & Pérez-Martínez LV (2018) Seed desiccation tolerance and germination of four *Puya* (Bromeliaceae) high-andean tropical species from Colombia. *Caldasia* 40: 177-187.
- Calvete EO, Kämpf AN & Suzin M (2002) Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. *Horticultura Brasileira* 20: 186-191.
- Carvalho CP, Hayashi AH, Braga MR & Nievola CC (2013) Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 71: 144-154.
- Castro RD, Bradford KJ & Hilhorst HWM (2004) Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In: Ferreira AG & Borghetti F* (eds.) *Germinação*. Artmed, Porto Alegre. Pp. 51-67.
- Demito A & Afonso ADL (2009) Qualidade das sementes de soja resfriadas artificialmente. *Engenharia na Agricultura* 17: 7-14.
- Duarte EF & Carneiro IF (2009) Qualidade fisiológica de sementes de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae) em função do estágio de maturação dos frutos. *Bioscience Journal* 25: 161-171.
- Freitas C, Carvalho V & Nievola CC (2015) Effect of sucrose concentrations on *in vitro* growth and subsequent acclimatization of the native bromeliad *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra. *Biotemas* 28: 37-42.
- George EF, Hall MA, De Klerk G-J (2008) *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. Springer, Dordrecht. 493p.
- Huh YS, Lee JK, Nam SY, Hong EY, Paek KY & Son SW (2016) Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cyrtopodium macranthos* Sw. *Journal of Plant Biotechnology* 43: 132-137.
- Kurita FMK & Tamaki V (2014) *In vitro* growth of the bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms with different concentrations of nitrogen. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 36: 279-285.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *In: Packer L & Douce R* (eds) *Methods in enzymology*. Academic Press, London. Pp. 350-382.

- Lembrechts R, Ceusters N, De Profta MP & Ceusters J (2017) Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. *Scientia Horticulturae* 224: 226-231.
- Lopes JS, Dias PC & Pereira MD (2005) Maturação fisiológica de sementes de quaresmeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 811-816.
- Luther HE (2014) An alphabetical list of bromeliad binomials. 14th ed. Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota. 41p.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente (2014) Atualização das listas de espécies ameaçadas. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/especies-ameacadas-de-extincao/atualizacao-das-listas-de-especies-ameacadas>>. Acesso em 3 setembro 2017.
- Molizane DM, Kanashiro S, Reis A & Barbedo CJ (2013) Maturação de sementes de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker e *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae). *Hoehnea* 40: 619-625.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nunes CF, Pasqual M, Santos DN, Custódio TN & Araújo AG (2008) Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 9-14.
- Oliveira Y, Anselmini JI, Cuquel FL, Pinto F & Quoirin M (2010) Pré-aclimatização *in vitro* de abacaxi-ornamental. *Ciência e Agrotecnologia* 34: 1647-1653.
- Oliveira AKM, Alves FF & Fernandes V (2018) Germinação de sementes de *Vochysia divergens* após armazenamento em três ambientes. *Ciência Florestal* 28: 525-531.
- Pasqual M, Finotti DR, Dutra L, Chagas EA & Ribeiro LO (2002) Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'poncã' em função do pH e da concentração de ágar. *Revista Brasileira de Agrociência* 8: 199-202.
- Pereira C, Cuquel FL & Panobianco M (2010) Germinação e armazenamento de sementes de *Nidularium innocentii* (Lem.). *Revista Brasileira de Sementes* 32: 36-41.
- Pereira JES, Maciel TMS, Costa FHS, Pereira MAA & Pereira A (2006) Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de mururu (*Astrocaryum ulei*). *Ciência e Agrotecnologia* 30: 251-256.
- Pickens KA, Affolter JM & Wetzstein HY (2003) Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. *HortScience* 38: 101-104.
- Samuel KOK, Salomé YES, Oumar S, Christophe ABY & Hilaire KT (2018) Influence of carbohydrates on callus proliferation during somatic embryogenesis in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae) var. Cayenne Smooth Cultivar CI 16]. *European Scientific Journal* 14: 287-297.
- Santos DS, Cardoso-Gustavson P & Nievola CC (2017) Stem elongation of ornamental bromeliad in tissue culture depends on the temperature even in the presence of gibberellic acid. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 230.
- Silva PPA, Kurita FMK & Tamaki V (2017) *In vitro* propagation of *Ananas comosus* var. *ananassoide* (Baker) Coppens & F. Leal (Bromeliaceae). *Científica* 45: 313-320.
- Vadillo G, Suni M & Cano A (2004) Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana de Biología* 11: 71-78.
- Versieux LM & Wanderley MGL (2015) Bromélias gigantes do Brasil. Offset Editora, Natal. 200p.
- Villela FA & Peres WB (2004) Coleta, beneficiamento e armazenamento. *In: Ferreira AG & Borghetti F* (eds.) Germinação. Artmed, Porto Alegre. Pp. 265-282.
- Wanderley MGL & Martins SE (2007) Bromeliaceae. *In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Melhem TS & Giulietti AM* (eds.) Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo. Vol. 5, pp. 39-161.

Editor de área: Dr. Claudio Barbedo

Artigo recebido em 09/10/2018. Aceito para publicação em 24/10/2019.



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.