

Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva

Osmotic agents and temperature on *in vitro* conservation of sempre-viva

Alone Lima-Brito^I Mara Márcia Sampaio Albuquerque^{II} Bruno Freitas Matos Alvim^{II}
Sheila Vitória Resende^{III} Moema Cortizo Bellintani^{III} José Raniere Ferreira de Santana^{IV}

RESUMO

A conservação *in vitro* é uma estratégia de conservação *ex situ* que garante a manutenção da integridade genética e biológica das espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. Os brotos foram inoculados em meio de cultura MS ½ contendo 7g L⁻¹ de ágar e suplementado com 60g L⁻¹ de sacarose, e com as concentrações de sacarose 15, 30 e 45g L⁻¹ combinados com 0 e 15g L⁻¹ de sorbitol ou manitol. As culturas foram mantidas em duas temperaturas (18 e 25°C). A porcentagem de sobrevivência das plantas foi avaliada mensalmente e ao final de 180 dias foram analisados o comprimento da parte aérea e da raiz, a porcentagem de folhas verdes, a porcentagem de explantes com brotos, o número de brotos por explante e o comprimento dos brotos. Os agentes osmóticos promoveram um decréscimo no crescimento das plantas, no entanto reduziram a sua viabilidade. Os resultados observados nos experimentos mantidos a 18°C foram significativamente superiores aos encontrados a 25°, para todas as variáveis analisadas. A conservação de *S. mucugensis* subsp. *mucugensis* pode ser feita à 18°C em meio de cultura MS ½ contendo 15g L⁻¹ de sacarose, por até 180 dias, sem subcultivo.

Palavras-chave: *Syngonanthus mucugensis* subsp. *mucugensis*, crescimento mínimo, cultura *in vitro*, conservação *ex situ*.

ABSTRACT

The *in vitro* conservation is an *ex situ* conservation strategy that ensures the maintenance of genetic and biological

integrity of species. The present study evaluated the effects of, osmotic agents and different temperature regimes on the *in vitro* conservation of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. The shoots were inoculated into half salt strength Murashige and Skoog culture medium (MS ½) containing 7g L⁻¹ of agar. The culture medium was supplemented with 60g L⁻¹ sucrose and with the sucrose concentrations 15, 30 and 45g L⁻¹ combined with 0 and 15g L⁻¹ of sorbitol or mannitol. Two different temperatures were used in these experiments (18 and 25°C). The percentage of plant survival was evaluated monthly and at 180 days were analyzed length of shoot and root, the percentage of green leaves, the percentage of explants with shoots and number of shoots per explants and shoot length. The addition of osmotic agents resulted in decreased growth of the plants and therefore reduced their viability. The averages observed in the experiments undertaken at 18°C were significantly superior to those observed at 25°C for all of the variables analyzed. *S. mucugensis* subsp. *mucugensis* can be cultured at 18°C in MS½ culture medium containing 15g L⁻¹ of sucrose, for up to 180 days, without subculturing.

Key words: *Syngonanthus mucugensis* subsp. *mucugensis*, minimal growth, *in vitro* culture, *ex situ* conservation.

INTRODUÇÃO

Syngonanthus mucugensis Giul. subsp. *mucugensis*, conhecida como sempre-viva de mucugê, é uma herbácea ornamental endêmica do município de

^IPrograma de Pós-graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), 44036-336, Feira de Santana, BA, Brasil. E-mail: lima_brito@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, UEFS, Feira de Santana, BA, Brasil.

^{III}Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

^{IV}Departamento de Biologia, UEFS, Feira de Santana, BA, Brasil.

Mucugê, na Chapada Diamantina, BA, Brasil. Essa espécie encontra-se ameaçada de extinção devido à exploração extrativista de suas flores para o mercado florístico (GIULIETTI et al., 1996; CERQUEIRA et al., 2008).

A conservação de sempre-viva de mucugê tem se restringido à preservação em seu ambiente natural no Parque Nacional da Chapada Diamantina. Isso torna necessária a utilização de técnicas complementares de conservação *ex situ* para manter a diversidade genética dessa espécie.

A conservação *in vitro* baseia-se no cultivo das coleções em laboratório, a partir das técnicas de cultura de tecidos vegetais; as quais garantem a manutenção da integridade genética e biológica de um elevado número de acessos em espaço reduzido, além de promover altas taxas de multiplicação em condições assépticas e permitir o intercâmbio de germoplasma (ENGELMANN, 1991; VILLALOBOS et al., 1991; GEORGE, 1993; FAY, 1994; RAO, 2004; FARIA et al., 2006; SARASAN et al., 2006).

A restrição do crescimento *in vitro* é uma técnica vantajosa, porque aumenta o período entre os subcultivos, reduz os custos com a manutenção do banco ativo de germoplasma e, principalmente, minimiza os riscos de alteração genética e contaminação (ENGELMANN, 1991; VILLALOBOS et al., 1991; LEMOS et al., 2002). Esse método tem sido aplicado com sucesso para a conservação de espécies ornamentais ameaçadas de extinção, a exemplo da orquídea *Ipea malabarica* (Reichb.f.) J. D. Hook e das bromélias *Dyckia distachya* Hassler e *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra (MARTIN & PRADEEP, 2003; POMPELI & GUERRA, 2004; PEDROSO et al., 2010).

O crescimento mínimo consiste em reduzir o metabolismo vegetal por alterações no ambiente de cultivo, como, decréscimo na intensidade da luz, fotoperíodo, trocas gasosas e temperatura de incubação da cultura, e por modificações no meio de cultura por meio da adição de reguladores vegetais e agentes osmóticos e redução dos componentes salinos e orgânicos (ENGELMANN, 1991; VILLALOBOS et al., 1991; WITHERS & WILLIAMS, 1998; LEMOS et al., 2002).

O decréscimo da temperatura é uma das estratégias mais utilizadas para manter as plantas em crescimento mínimo por reduzir o metabolismo da planta, incluindo alterações no conteúdo e ação das enzimas e na composição e funcionamento das membranas celulares (LEMOS et al., 2002; LÉDO et al., 2007). Essa técnica tem sido utilizada para a conservação de diversas espécies vegetais, com respostas que variam em função da sensibilidade à baixa temperatura

(NEGASH et al., 2001; LEMOS et al., 2002; FARIA et al., 2006). A combinação de baixas temperaturas com a adição de reguladores vegetais ou agentes osmóticos no meio de cultura tem sido apontada como uma alternativa eficiente para a conservação de germoplasma *in vitro*.

Os agentes osmóticos como a sacarose, o manitol e o sorbitol, agem sobre o crescimento reduzindo o potencial hídrico do meio de cultura e conseqüentemente inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante (CALDAS et al., 1998; ENGELMANN, 1991; LÉDO et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de brotos micropropagados de *S. mucugensis* subsp. *mucugensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e meio de cultura

Foram utilizados como explante brotos com aproximadamente 10mm de comprimento, obtidos por organogênese direta conforme metodologia descrita por LIMA-BRITO et al. (2011).

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 15mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade da concentração salina (MS ½), gelificado com 7g L⁻¹ de agar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, realizada à 121°C por 15 minutos.

Agentes osmóticos e temperatura

O meio de cultura foi suplementado com 60g L⁻¹ de sacarose com potencial osmótico (Ψ_o) -0,4340MPa e com as concentrações de sacarose 15, 30 e 45g L⁻¹ (correspondendo aos Ψ_o -0,1085, -0,2170 e -0,3255MPa, respectivamente), combinados com 0 e 15g L⁻¹ (Ψ_o = -0,1085MPa) de sorbitol ou manitol, constituindo os seguintes tratamentos: T1- 15g L⁻¹ de sacarose; T2- 30g L⁻¹ de sacarose; T3- 45g L⁻¹ de sacarose; T4- 60g L⁻¹ de sacarose; T5- 15g L⁻¹ de sacarose + 15g L⁻¹ de sorbitol; T6- 30g L⁻¹ de sacarose + 15g L⁻¹ de sorbitol; T7- 45g L⁻¹ de sacarose + 15g L⁻¹ de sorbitol; T8- 15g L⁻¹ de sacarose + 15g L⁻¹ de manitol; T9- 30g L⁻¹ de sacarose + 15g L⁻¹ de manitol; e T10- 45g L⁻¹ de sacarose + 15g L⁻¹ de manitol.

As culturas foram mantidas em câmara do tipo B.O.D. a 18°C e em sala de crescimento a 25±3°C. O delineamento experimental foi o DIC em arranjo fatorial 10x2 (agente osmótico x temperatura), com dez repetições e quatro tubos por repetição (um explante por tubo).

A porcentagem de sobrevivência (%S) foi avaliada mensalmente e aos 180 dias de armazenamento

foram analisados: comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), porcentagem de folhas verdes (%FV), porcentagem de explantes com brotos (%B), número de brotos por explante (NB) e comprimento dos brotos (CB).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativo, as médias foram submetidas ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o software Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação “agente osmótico x temperatura” foi significativa para as variáveis comprimento da parte aérea e da raiz e porcentagem de sobrevivência e de folhas verdes (Tabela 1). Isso demonstra que diferentes fatores químico e físicos podem interagir entre si na conservação das plantas *in vitro*, o que justifica a importância de serem testados conjuntamente (GEORGE, 1993; SARKAR & NAIK, 1998). Observou-se efeito isolado do agente osmótico e da temperatura para porcentagem de explantes com brotos, número de brotos por explante e comprimento dos brotos (Tabela 2).

Nas plantas mantidas a 18°C, não houve diferenças significativas entre 15 e 30g L⁻¹ de sacarose para comprimento da parte aérea (27,30 e 23,40mm, respectivamente) e comprimento da raiz (28,70 e 23,40mm, respectivamente), sendo observada uma redução dessas variáveis com o aumento da concentração de sacarose para 45 e 60g L⁻¹ (Tabela 1). Esses resultados indicam que a sacarose, quando utilizada em altas concentrações, diminui o potencial hídrico do meio de cultura, o que inibe a absorção de água e nutrientes pelo explante, reduzindo o crescimento *in vitro* (ENGELMANN, 1991; CALDAS et al., 1998).

O decréscimo no comprimento da parte aérea e no comprimento da raiz em resposta ao aumento na concentração de sacarose também foi observado a 25°C de temperatura. As maiores médias para essas variáveis foram encontradas no tratamento com 15g L⁻¹ de sacarose (Tabela 1), corroborando os resultados relatados por SILVA et al. (2005), que obtiveram melhores taxas de crescimento de plantas de *S. mucugensis in vitro* a 25°C em meio contendo 15g L⁻¹ de sacarose, quando comparado com as concentrações 20 e 30g L⁻¹.

Nos tratamentos suplementados com a combinação de sacarose com sorbitol ou manitol, também foi observada uma redução das variáveis comprimento da parte aérea e da raiz, à medida que

houve aumento na concentração total de carboidratos no meio, tanto a 18°C como a 25°C de temperatura (Tabela 1).

Comparando os tipos de agentes osmóticos, nas duas temperaturas testadas, não foram observadas diferenças significativas para comprimento da parte aérea entre os meios suplementados com sacarose e sacarose + sorbitol tanto na concentração total de 30g L⁻¹ como de 45g L⁻¹. Os resultados obtidos nesses tratamentos foram significativamente superiores aos que utilizaram o carboidrato manitol. Nas duas temperaturas testadas, as menores médias para comprimento da parte aérea foram obtidas na concentração total de 60g L⁻¹ sem diferenças significativas entre os tipos de carboidratos utilizados, não diferindo de 45g L⁻¹ a 25°C (Tabela 1).

O sorbitol e o manitol são açúcares alcoóis que geralmente não são metabolizados pelas plantas e por isso são empregados para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (GEORGE, 1993). Para *S. mucugensis* subsp. *mucugensis*, o manitol mostrou-se mais eficiente que o sorbitol na redução do crescimento das plantas, corroborando os resultados obtidos para *Solanum tuberosum* L., *Vanilla* sp. e *Cocos nucifera* L. (FORTES & PEREIRA, 2001; DIVAKARAN et al., 2006; LÉDO et al., 2007).

Para comprimento da raiz, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com sacarose, sacarose + sorbitol e sacarose + manitol, nas duas temperaturas, comparando-se as concentrações totais de carboidratos. As plantas mantidas a 25°C apresentaram maiores valores para esta variável em 15g L⁻¹ de sacarose, que diferiu significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1).

O decréscimo do comprimento da parte aérea e da raiz de *S. mucugensis* subsp. *mucugensis*, em resposta à redução do potencial hídrico do meio de cultura, corrobora os resultados obtidos para *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link. e *C. nucifera* conservadas *in vitro* (GONÇALVES & ROMANO, 2007; LÉDO et al., 2007). No entanto, o aumento da concentração de carboidratos no meio não é indicado para a conservação *in vitro* de *S. mucugensis* subsp. *mucugensis*, visto que reduziu a viabilidade das plantas.

Aos 30 dias de conservação, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para a porcentagem de sobrevivência nas duas temperaturas testadas. A partir de 60 dias de observação, houve uma redução dessa variável, especialmente nos meios com maior concentração de

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol no comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CR) e na porcentagem de sobrevivência (%S) e de folhas verdes (%FV) das plantas de *Syngonanthus mucugensis* subsp. *mucugensis* conservadas *in vitro* durante 180 dias, em duas temperaturas: 18 e 25°C.

| -----Agente osmótico (g L ⁻¹)----- | | | | -----Temperatura----- | |
|--|----------|---------|-------|-----------------------|-----------------|
| | | | | -----18° C----- | -----25° C----- |
| Sacarose | Sorbitol | Manitol | Total | -----CPA(mm)----- | |
| 15 | - | - | 15 | 27,30 A a | 25,80 A a |
| 30 | - | - | 30 | 23,40 A a | 15,20 B b |
| 45 | - | - | 45 | 12,50 B a | 3,70 C b |
| 60 | - | - | 60 | 6,90 D a | 0,00 D b |
| 15 | 15 | - | 30 | 21,70 A a | 15,70 B b |
| 30 | 15 | - | 45 | 17,50 B a | 5,50 C b |
| 45 | 15 | - | 60 | 6,20 D a | 0,00 D b |
| 15 | - | 15 | 30 | 15,90 B a | 3,40 C b |
| 30 | - | 15 | 45 | 12,60 C a | 0,30 D b |
| 45 | - | 15 | 60 | 4,50 D a | 0,40 D b |
| | | | | -----CR (mm)----- | |
| 15 | - | - | 15 | 28,70 A a | 22,50 A a |
| 30 | - | - | 30 | 23,40 A a | 7,90 B b |
| 45 | - | - | 45 | 12,50 B a | 2,70 C b |
| 60 | - | - | 60 | 7,00 C a | 0,00 D b |
| 15 | 15 | - | 30 | 24,70 A a | 10,80 B b |
| 30 | 15 | - | 45 | 18,80 B a | 3,30 C b |
| 45 | 15 | - | 60 | 4,30 C a | 0,00 D b |
| 15 | - | 15 | 30 | 26,00 A a | 6,00 B b |
| 30 | - | 15 | 45 | 18,20 B a | 2,50 C b |
| 45 | - | 15 | 60 | 5,00 C a | 0,00 D b |
| | | | | S (%) | |
| 15 | - | - | 15 | 97,5 A a | 89,0 A b |
| 30 | - | - | 30 | 97,5 A a | 65,0 B b |
| 45 | - | - | 45 | 68,0 B a | 20,0 C b |
| 60 | - | - | 60 | 42,5 C a | 0,0 D b |
| 15 | 15 | - | 30 | 92,5 A a | 65,0 B b |
| 30 | 15 | - | 45 | 65,0 B a | 25,0 C b |
| 45 | 15 | - | 60 | 25,0 C a | 2,5 D b |
| 15 | - | 15 | 30 | 90,0 A a | 17,5 C b |
| 30 | - | 15 | 45 | 60,0 B a | 2,5 D b |
| 45 | - | 15 | 60 | 22,5 C a | 2,5 D b |
| | | | | -----FV (%)----- | |
| 15 | - | - | 15 | 89,1 A a | 69,7 A b |
| 30 | - | - | 30 | 71,7 A a | 31,9 B b |
| 45 | - | - | 45 | 34,2 B a | 6,2 C b |
| 60 | - | - | 60 | 15,0 C a | 0,0 D b |
| 15 | 15 | - | 30 | 73,9 A a | 25,0 B b |
| 30 | 15 | - | 45 | 38,1 B a | 8,1 C b |
| 45 | 15 | - | 60 | 9,3 C a | 0,0 D b |
| 15 | - | 15 | 30 | 51,4 B a | 4,4 C b |
| 30 | - | 15 | 45 | 27,2 B a | 0,6 D b |
| 45 | - | 15 | 60 | 8,7 C a | 0,6 D b |

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol na porcentagem de plantas com brotos (%B), número de brotos por planta (NB) e comprimento dos brotos (CB) de *S. mucugensis* subsp. *mucugensis* conservadas *in vitro* durante 180 dias, em duas temperaturas: 18 e 25°C.

| -----Agente osmótico (g L ⁻¹)----- | | | | -----Temperatura----- | |
|--|----------|---------|-------|-----------------------|-----------------|
| Sacarose | Sorbitol | Manitol | Total | ----18° C---- | -----25° C----- |
| | | | | -----B (%)----- | |
| 15 | - | - | 15 | 7,5 C a | 2,5 C b |
| 30 | - | - | 30 | 10,0 C a | 2,5 C b |
| 45 | - | - | 45 | 12,5 C a | 7,5 B b |
| 60 | - | - | 60 | 2,5 C a | 0,0 D b |
| 15 | 15 | - | 30 | 22,5 B a | 12,5 A b |
| 30 | 15 | - | 45 | 37,5 A a | 15,0 A b |
| 45 | 15 | - | 60 | 7,5 C a | 0,0 D b |
| 15 | - | 15 | 30 | 20,0 B a | 0,0 D b |
| 30 | - | 15 | 45 | 35,0 A a | 0,0 D b |
| 45 | - | 15 | 60 | 15,0 B a | 0,0 D b |
| | | | | -----NB----- | |
| 15 | - | - | 15 | 0,40 B a | 0,05 B b |
| 30 | - | - | 30 | 0,70 B a | 0,08 B b |
| 45 | - | - | 45 | 0,88 B a | 0,50 B b |
| 60 | - | - | 60 | 0,03 B a | 0,00 C b |
| 15 | 15 | - | 30 | 0,75 B b | 2,60 A a |
| 30 | 15 | - | 45 | 1,38 A b | 3,18 A a |
| 45 | 15 | - | 60 | 0,33 B a | 0,00 C b |
| 15 | - | 15 | 30 | 1,78 A a | 0,00 C b |
| 30 | - | 15 | 45 | 1,65 A a | 0,00 C b |
| 45 | - | 15 | 60 | 0,45 B a | 0,00 C b |
| | | | | -----CB (mm)----- | |
| 15 | - | - | 15 | 1,40 B a | 0,20 B b |
| 30 | - | - | 30 | 1,00 B a | 0,40 B b |
| 45 | - | - | 45 | 0,90 B b | 1,60 A a |
| 60 | - | - | 60 | 0,30 B a | 0,00 B b |
| 15 | 15 | - | 30 | 2,50 A a | 1,10 A ab |
| 30 | 15 | - | 45 | 3,50 A a | 2,20 A a |
| 45 | 15 | - | 60 | 0,90 B a | 0,00 B b |
| 15 | - | 15 | 30 | 1,30 B a | 0,00 B b |
| 30 | - | 15 | 45 | 2,90 A a | 0,00 B b |
| 45 | - | 15 | 60 | 1,30 B a | 0,00 B b |

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

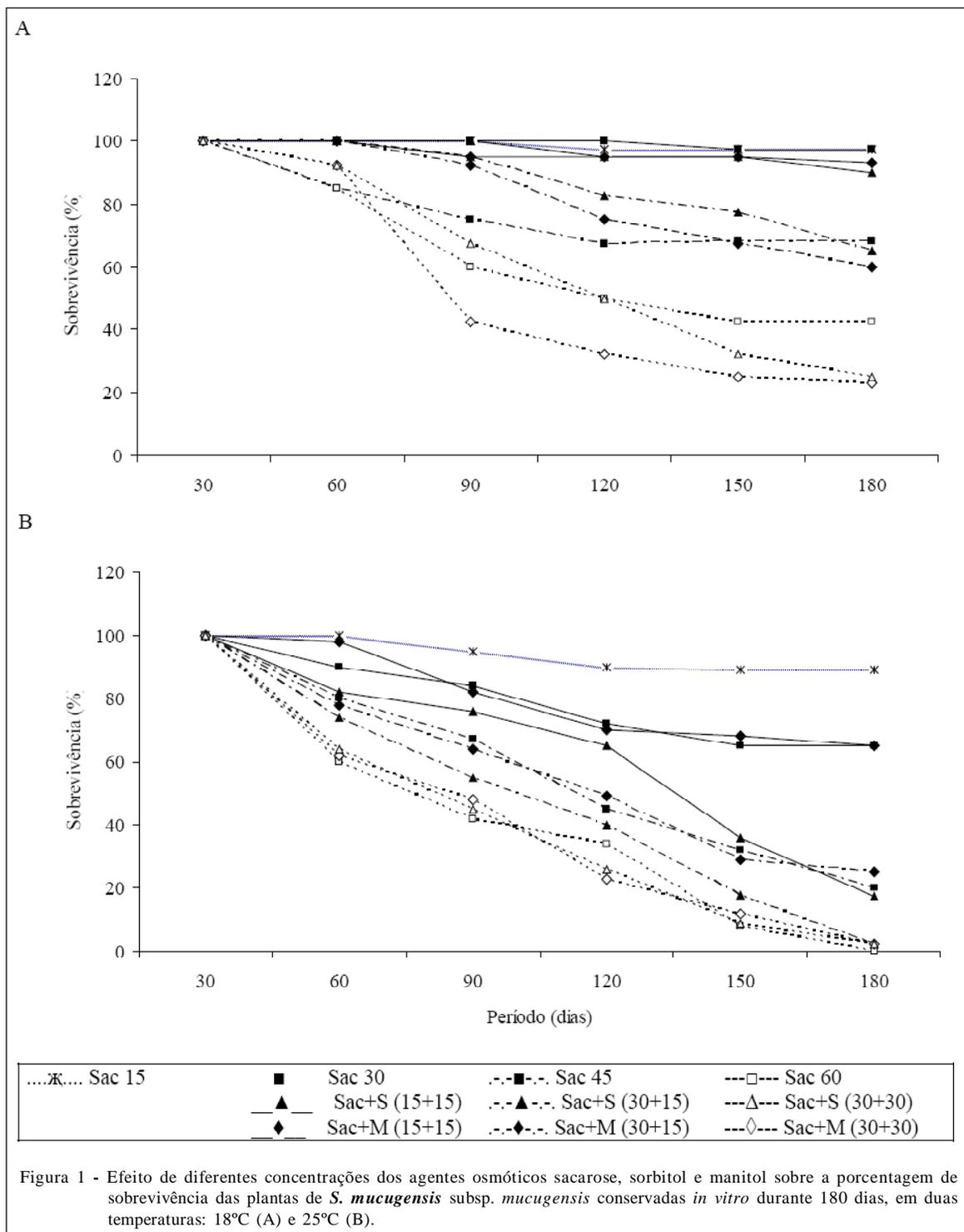
carboidratos, com um decréscimo mais pronunciado da porcentagem de sobrevivência nas plantas mantidas a 25°C (Figura 1).

Ao final de 180 dias de cultivo a 18°C, as médias para porcentagem de sobrevivência obtidas em meio suplementado com 15 e 30g L⁻¹ de sacarose (97,5%) e 15g L⁻¹ de sacarose combinada com 15g L⁻¹ de sorbitol (92,5%) ou manitol (90,0%) não diferiram entre si, sendo significativamente superiores aos demais tratamentos. Para porcentagem de folhas verdes, o melhor resultado foi encontrado no tratamento que continha 15g L⁻¹ de sacarose (89,1%), seguido dos meios suplementados

com 30g L⁻¹ de sacarose (71,7%) e 15g L⁻¹ de sacarose combinado com sorbitol (73,9%) (Tabela 1).

Na temperatura de 25°C, as médias obtidas para porcentagem de sobrevivência (89,0%) e de folhas verdes (69,7%) em meio contendo 15g L⁻¹ de sacarose foram significativamente superiores aos demais tratamentos, o que demonstra que na maior temperatura testada o efeito do aumento da concentração de carboidratos foi mais efetivo na redução da viabilidade das plantas de *S. mucugensis* subsp. *mucugensis in vitro* (Tabela 1).

As menores médias para porcentagem de sobrevivência e de folhas verdes foram obtidas em meio



contendo manitol, quando comparados com os meios suplementados com sacarose ou sacarose e sorbitol, principalmente nas plantas mantidas a 25°C (Tabela 1), o que demonstra que a adição de manitol ao meio nas concentrações testadas é um fator de estresse para o cultivo *in vitro* da espécie estudada. O decréscimo da

sobrevivência das plantas em resposta a adição de manitol ao meio de cultura, também foi relatado para *S. tuberosum* (FORTES & PEREIRA, 2001).

Comparando as duas temperaturas testadas, as maiores médias para comprimento da parte aérea e da raiz e porcentagem de sobrevivência e de folhas

verdes, foram obtidas a 18°C, independente do tipo e concentração de carboidrato utilizado. Apenas nos tratamentos que utilizaram 15g L⁻¹ de sacarose não houve diferença entre as temperaturas para comprimento da parte aérea e da raiz (Tabela 1). Em geral, temperaturas mais baixas são indicadas para a conservação *in vitro* por reduzir o metabolismo da planta, o que favorece o crescimento mínimo (LEMOS et al., 2002; LÉDO et al., 2007). Essa estratégia tem sido aplicada com sucesso para a conservação de diversas espécies vegetais, como *Saccharum* sp., *Passiflora giberti* N.E. Brown e *C. nucifera* (LEMOS et al., 2002; FARIA et al., 2006; LÉDO et al., 2007).

Neste estudo, a menor temperatura testada não reduziu o crescimento das plantas, mas manteve a viabilidade do material conservado por um período de 180 dias, o que pode estar relacionado à temperatura comumente utilizada para a conservação *in vitro* de espécies tropicais, que varia entre 15 a 18°C (RAO, 2004), ou à temperatura média anual do ambiente de ocorrência natural da espécie estudada, que é de aproximadamente 19,6°C (SILVA & AZEVEDO, 2000)

Assim, a utilização de 18°C, combinada com a menor concentração de sacarose utilizada (15g L⁻¹), proporcionou a melhor condição para conservação de plantas de *S. mucugensis* subsp. *mucugensis*, corroborando os resultados obtidos para *Saccharum* sp. (LEMOS et al., 2002).

Os resultados obtidos para porcentagem de plantas com brotos, número de brotos por planta e comprimento dos brotos nas plantas mantidas a 18°C foram significativamente superiores às médias obtidas a 25°C para a maioria das combinações de carboidratos testadas (Tabela 2).

As maiores médias para porcentagem de plantas com brotos e número de brotos por planta, na temperatura de 18°C, foram observadas em meio contendo 30g L⁻¹ de sacarose combinados com sorbitol (37,5% e 1,38 respectivamente), ou manitol (35,0% e 1,65, respectivamente). Para número de brotos por planta, estes tratamentos não diferiram do meio suplementado com 15g L⁻¹ de sacarose combinado com 15g L⁻¹ de sorbitol (1,78). A 25°C, médias significativamente superiores para porcentagem de brotos por planta e número de brotos por planta foram obtidas em meios suplementados com 15 e 30g L⁻¹ de sacarose combinados com sorbitol (Tabela 2).

Nas plantas submetidas a 18°C, os maiores valores para comprimento do broto foram observados nos tratamentos que continham 15 e 30g L⁻¹ de sacarose combinado com sorbitol e no meio com 30g L⁻¹ de sacarose combinado com manitol. A 25°C, as maiores médias para esta variável foram obtidas nos meios

contendo 45g L⁻¹ de sacarose e 15 e 30g L⁻¹ de sacarose combinado com sorbitol (Tabela 2).

É provável que a produção de brotos *in vitro* em *S. mucugensis* subsp. *mucugensis* a partir de planta intacta esteja relacionada ao estresse osmótico causado pela adição de carboidratos ao meio de cultura. Entretanto, não foram encontradas altas taxas de porcentagem de plantas com brotos, número de brotos por explante e comprimento dos brotos nos meios com os menores potenciais hídricos testados, o que deve estar relacionado à redução da porcentagem de sobrevivência das plantas nestes tratamentos (Tabela 2).

Alterações nas fases de crescimento e reprodução, como a produção de brotos, são estratégias utilizadas pelos vegetais como mecanismo para o escape a seca (LARCHER, 2000). Em *S. mucugensis* subsp. *mucugensis*, a emissão de brotações e morte da planta na estação seca foi relatada em estudos fenológicos por CERQUEIRA et al. (2008). Assim, a obtenção de brotos em decorrência do déficit hídrico observada neste trabalho reproduz um comportamento natural da espécie na condição *ex vitro*.

Os resultados obtidos demonstraram o potencial da técnica *in vitro* para a conservação de *S. mucugensis* subsp. *mucugensis*. A utilização de meio de cultura MS ½ contendo 15g L⁻¹ de sacarose a 18°C possibilita a conservação dessa espécie por até 180 dias, sem subcultivo.

REFERÊNCIAS

- CALDAS L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 1998. p.87-132.
- CERQUEIRA, C.O. et al. Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.22, n.4, p.962-969, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v22n4/a07v22n4.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1590/S0102-33062008000400007.
- DIVAKARAN, M. et al. Conservation of *Vanilla* species *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.110, n.2, p.175-180. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423806002792>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1016/j.scienta.2006.07.003.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasma: a review. **Euphytica**, v.57, p.227-243, 1991. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/k2gw613148g6637n/>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1007/BF00039669.
- FARIA G.A. et al. Sucrose and sorbitol effect in the *in vitro* conservation of *Passiflora giberti* NE Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.267-270, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

- 29452006000200025>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1590/S0100-29452006000200025.
- FAY, M.F. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? **Biodiversity Conservation**, v.3, p.176-183, 1994. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/p534k2vn0w34144g/>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1007/BF02291887.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR** Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003. V.3, n.4.
- FORTES G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.10, p.1261-1264, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v36n10/6750.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1590/S0100-204X2001001000007.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1. The technology. 2.ed. Edington, Wilts, London: Exegetics, 1993. 1574p.
- GIULIETTI, A.M. et al. Estudos em sempre vivas: Taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.10, n.2, p.329-377, 1996. Disponível em: <<http://kdb.kew.org/kdb/detailedresult>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 328863.
- GONÇALVES S.; ROMANO, A. *In vitro* minimum growth conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. **Biologia Plantarum**, v.51, p.795-798, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t761h535380p120v/fulltext.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1007/s10535-007-0163-0,
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA Artes e Textos, 2000. 531p.
- LÉDO, A.S. et al. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, v.19, n.4, p.346-351, 2007. Disponível em: <<http://www.magistra.ufrb.edu.br/publica/19.4%20PDF/Artigos%20Magistra%202007%20-%2013.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011.
- LEMOS, E.E.P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileiro**, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/0D/p67ab/v37n10/13213.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1590/S0100-204X2002001000002.
- LIMA-BRITO, A. et al. *In Vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.3, p.501-510, 2011. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/site/_adm/upload/revista/35-3-2011_10.pdf>. Acesso em: 01 jun 2011.
- MARTIN, K.P.; PRADEEP, A.K. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipsea malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.197-200, 2003. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t1408853k69x3272/fulltext.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1023/A:1023971625994.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1111/j.13993054.1962.tb08052.x.
- NEGASH A. et al. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, n.2, p.107-111, 2001. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t20xn169nx0v876j/fulltext.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1023/A:1010647905508.
- PEDROSO, A.N.V. et al. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.3, p.407-414, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-84042010000300004&script=sci_arttext>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1590/S0100-8404201000030000.
- POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, n.3, p.273-279, 2004. Disponível em: <<http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/uploads/c8128f42-3ca0-bf38.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011.
- RAO, N.K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.2, p.136-145, 2004. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2004/Feb/Rao.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011.
- SARASAN, V. et al. Conservation *in vitro* of threatened plants: progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Development Biology Plant**, v.42, p.206-214, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/m8431506w4866408/fulltext.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1079/IVP2006769.
- SARKAR D.; NAIK, P.S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. **Euphytica**, v.102, p.275-280, 1998. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/h552135010nu14mp/fulltext.pdf>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1023/A:1018309300121.
- SILVA G.B.; AZEVEDO, P.V. Potencial edafoclimático da “Chapada Diamantina” no Estado da Bahia para o cultivo de Cítrus. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.8, n.1, p.133-139, 2000.
- SILVA, J.R.S. et al. Efeito da sacarose sobre o enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. **Sitientibus: Série ciências biológicas**, v.5, n.2, p.56-59, 2005. Disponível em: <http://www2.uefs.br/revistabiologia/pg5_n2.html>. Acesso em: 01 jun 2011.
- VILLALOBOS, V.M. et al. The use of biotechnology in the conservation of tropical germoplasma. **Biotechnology Advances**, v.9, p.197-215, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/073497509190004F>>. Acesso em: 01 jun 2011. doi: 10.1016/0734-9750(91)90004-F.
- WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C. et al. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CBPH, 1998. p.297-330.