

Multiplicação *in vitro* de *Neoregelia johannis* (Carrière) L.B. Smith em meio líquido sob diferentes concentrações de nutrientes¹

Eveline Calderan Meneghetti² , Leandro Silva de Oliveira³ & Marcilio de Almeida²

¹Parte da dissertação de mestrado da primeira autora no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

²Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Ciências Biológicas, Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. eveline.calderan@usp.br

³Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Avenida Universitária, 1000, CEP 39404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

Recebido em 02.V.2019

Aceito em 22.VIII.2019

DOI 10.21826/2446-82312019v74e2019012

RESUMO - A importância da micropropagação para espécies da família Bromeliaceae é crescente, porém, poucos trabalhos relatam o papel da nutrição na multiplicação *in vitro*. Visando relacionar aspectos morfofisiológicos da micropropagação à disponibilidade de nutrientes, principalmente do nitrogênio, brotações de *Neoregelia johannis* foram subcultivadas nos meios de cultura MS, ½ MS e WPM, suplementados com as mesmas concentrações de reguladores de crescimento. A taxa de multiplicação foi semelhante nos três meios de cultura, sendo que a maior taxa de multiplicação, maior acúmulo de nitrogênio total e proteico ocorreu no meio de cultura MS. Mesmo produzindo brotações menores, o meio de cultura WPM representa uma alternativa viável para a manutenção de um banco de germoplasma e para a manutenção de genótipos de interesse em biofábricas, visto que apresenta desenvolvimento uniforme de brotações. O meio de cultura MS seria recomendado para casos específicos, quando é necessário acelerar a multiplicação e principalmente crescimento das brotações.

Palavras-chave: Bromeliaceae, micropropagação, nitrogênio, paisagismo

ABSTRACT - *In vitro* multiplication of *Neoregelia johannis* (Carrière) L. B. Smith in liquid medium under different concentrations of nutrients. The importance of micropropagation to Bromeliaceae species is increasing, however few studies report the role of nutrition in *in vitro* multiplication. In order to correlate micropropagation morphophysiological aspects with regards to availability of nutrients, mainly nitrogen, *Neoregelia johannis* shoots were subcultured in the media culture MS, ½ MS and WPM, supplemented with the same concentrations of plant growth regulators. The multiplication rate was similar for all the culture media, with the highest multiplication rate, in addition to the highest accumulation of total and protein nitrogen, in the MS culture medium. Even producing the smallest shoots, the means of cultivation ½ MS and WPM represent a viable alternative for the maintenance of germplasm bank and for the maintenance of important genotypes in plant biofactories, considering that they present uniform results. The MS medium culture would be recommended for specific cases, when it is necessary to accelerate the multiplication and especially the growth of the shoots.

Keywords: Bromeliaceae, micropropagation, nitrogen, landscaping

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae Juss. é representada por 3.348 espécies distribuídas em 58 gêneros (Luther 2012), o Brasil possui cerca de 40 gêneros e 1.300 espécies, destas 1.100 são citadas como endêmicas (BFG 2015). Possuem grande diversidade e desempenham um papel fundamental no ciclo de nutrientes e no uso da água, tornando-se essenciais à manutenção da biodiversidade nos ecossistemas (Coxson & Nadkarni 1995). O gênero *Neoregelia* apresenta 125 espécies, 97 estão presentes na Mata Atlântica o que coloca este gênero entre os de maior riqueza desse bioma, além disso, 87 espécies são endêmicas e muitas destas são amplamente utilizadas como ornamentais, por essa razão

sofrem forte pressão extrativista com a coleta ilegal a fim de abastecer o mercado de paisagismo (Carneiro *et al.* 1999, Martinelli *et al.* 2008).

Dentre as características a serem consideradas em relação ao gênero *Neoregelia*, estão a presença do fitotelmo e dos tricomas peltados absorventes, frequentemente denominados de escamas. O fitotelmo é um tanque biológico formado na base da superfície adaxial das folhas pela sobreposição destas na roseta. Essa estrutura atua como reservatório de água e nutrientes e é onde se insere a inflorescência; as escamas, por sua vez, atuam na absorção de água e nutrientes na ausência de raízes ou quando estas apresentam função de fixação no substrato (Benzing 2000). No fitotelmo, são encontradas diversas fontes de nitrogênio

utilizadas para a nutrição da planta como, nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), uréia, aminoácidos e proteínas, oriundos da atmosfera, da deposição de folhas e da interação com animais (Inselsbacher *et al.* 2007, Gonçalves *et al.* 2016).

Nesse contexto, a crescente importância econômica da espécie *Neoregelia johannis* no setor paisagístico, tem despertado o interesse na aplicação de técnicas de cultura de tecidos que possibilitem a propagação em larga escala para fins ornamentais, captura e fixação de ganhos genéticos advindos de programas de melhoramento, bem como para a conservação de genótipos (Droste *et al.* 2005, Dal Vesco *et al.* 2014).

Durante a cultura de tecidos, o meio de cultura pode ser utilizado na forma sólida, quando adicionado um agente solidificante como o ágar, ou líquido, que apresenta a vantagem de ter um preparo mais rápido e barato, além de apresentar maior homogeneidade e disponibilidade dos nutrientes (Caldas *et al.* 1998). A formulação do meio de cultura deve fornecer os nutrientes e substâncias indispensáveis para o crescimento das plantas, além disso, o balanço entre nitrogênio, fósforo e cálcio atua na expressão dos processos morfológicos (Ramage & Williams 2002). Porém, pouca atenção é dada à atuação dos nutrientes durante o desenvolvimento *in vitro*, apesar destes serem os principais componentes do meio de cultura (Gribble *et al.* 2002, Oberschelp & Gonçalves 2016).

O meio de cultura predominantemente utilizado na cultura de tecidos de espécies da família Bromeliaceae é o comumente denominado MS desenvolvido por Murashige & Skoog (1962) *apud* Martins *et al.* (2015). Entretanto, algumas espécies de bromélias se desenvolvem bem em diluições desse meio, visto que as necessidades endógenas, ou mesmo a eficiência em absorver fontes nitrogenadas pode variar entre as espécies. Sasamori *et al.* (2016) verificou que a diluição dos macronutrientes ou apenas dos sais nitrogenados para 25% da formulação original de MS foi adequada para a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* Gaudich. Por outro lado, Martins *et al.* (2015) definiram que para a multiplicação *in vitro* de *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley o melhor resultado é alcançado utilizando o dobro da concentração de sais de MS.

Portanto, há relevante importância no estudo da atuação dos nutrientes no desenvolvimento *in vitro* de espécies da família Bromeliaceae, principalmente em relação ao nitrogênio, visto que é o principal componente de aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofila e coenzimas, além de atuar na síntese endógena de hormônios (Kurita & Tamaki 2014, Mercier *et al.* 1997). Dessa forma, a deficiência de nitrogênio limita o crescimento e o desenvolvimento vegetal, mas em excesso, pode levar a anomalias morfológicas, diminuição do crescimento e desperdício de insumos (Paula 2001).

Nesse contexto, diante da escassez de informações relacionadas à micropropagação de *N. johannis*, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de três meios de cultura líquidos na multiplicação *in vitro* desta espécie, visando sua conservação *in vitro* e produção de mudas em larga escala.

MATERIAL E MÉTODOS

Estabelecimento e condições de cultivo *in vitro*

As brotações utilizadas neste estudo, foram provenientes de um banco clonal *in vitro* de *N. johannis* estabelecido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Para tanto, sementes foram germinadas *in vitro* em meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) acrescido de sacarose (30 g L^{-1}) e ágar ($6,0 \text{ g L}^{-1}$), isento de reguladores de crescimento com o pH ajustado para 5,8. Após o desenvolvimento das plântulas, estas foram transferidas para o mesmo meio de cultura, porém, suplementado com $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (ANA) e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) para a indução de brotações (meio de multiplicação), onde permaneceram por três subcultivos consecutivos de 30 dias cada.

Transcorrido esse período, uma única microcepa (conjunto de brotações multiplicadas *in vitro*) foi isolada, suas brotações foram individualizadas e transferidas para o mesmo meio de cultura de multiplicação pelo período de 90 dias, visando a clonagem do material. Ao todo foram realizados três subcultivos, com transferências das brotações, a cada 30 dias, para renovação do meio de cultura. Posteriormente, as microcepas desenvolvidas foram transferidas para o meio de cultura MS, isento de reguladores de crescimento e subcultivadas ao longo de três subcultivos sucessivos de 30 dias para a renovação do meio de cultura e para favorecer o crescimento das brotações, a partir desse período o experimento foi iniciado.

Em relação às condições de cultivo *in vitro*, tanto para o estabelecimento do banco clonal, quanto para o experimento, o material foi mantido em sala de crescimento com temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), luminosidade ($42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e fotoperíodo (16 h) controlados.

Multiplicação das brotações

Brotações procedentes do banco clonal *in vitro*, com aproximadamente dois centímetros de comprimento, sem raízes e com quatro folhas totalmente expandidas, foram transferidas para os meios de cultura: MS, $\frac{1}{2}$ MS (meio de cultura MS com metade da concentração de sais e vitaminas) e WPM (Lloyd & McCown 1980), suplementados com $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e isentos de agentes geleificantes (meio de cultura líquido), foi utilizado $30,0 \text{ mL}$ de meio de cultura por pote e não utilizou-se nenhuma forma de suporte para as brotações, de modo que estas ficaram parcialmente submersas. As brotações foram mantidas nesses tratamentos por 120 dias (quatro subcultivos sucessivos de 30 dias) sem agitação contínua, com renovação dos mesmos meios de cultura a cada 30 dias.

Ao final de cada subcultivo, avaliou-se o número médio de brotações desenvolvidas e atribuí-se notas relativas ao tamanho dessas brotações: + (brotações $\leq 1,0 \text{ cm}$), ++ (brotações $> 1,0$ e $< 2,0$), +++ (brotações $\geq 2,0 \text{ cm}$), e ao vigor das mesmas: + (regular, definido pela coloração verde

clara das brotações e presença de folhas senescentes), ++ (bom, brotações com coloração verde e presença de folhas cloróticas) e +++ (ótimo, definido pela coloração verde escuro e ausência de folhas senescentes).

Após os 120 dias de cultivo *in vitro*, as microcepas foram pesadas individualmente, armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em estufa a 60°C até obtenção de massa constante para a avaliação da massa da matéria seca e da taxa de crescimento relativo. A avaliação da taxa de crescimento relativo foi definida com as médias da massa da matéria seca, segundo a equação abaixo estabelecida por Hunt (1982), onde: R (%) = taxa de crescimento relativo (%); M1 = massa seca inicial (g); M2 = massa seca final (g); T1 = tempo inicial (dias); T2 = tempo final (dias).

$$R(\%) = \frac{\text{Ln } M2 - \text{Ln } M1}{T2 - T1} \times 100$$

Após a mensuração da massa da matéria seca, as microcepas foram separadas para a realização das análises químicas referentes ao teor de nitrogênio total e fracionado (nitrogênio amoniacal, nítrico e proteico) (Malavolta *et al.* 1987).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (meios de cultura, MS, ½ MS e WPM), cada qual com cinco repetições, sendo cada parcela experimental constituída por um frasco com cinco brotações de *N. johannis*.

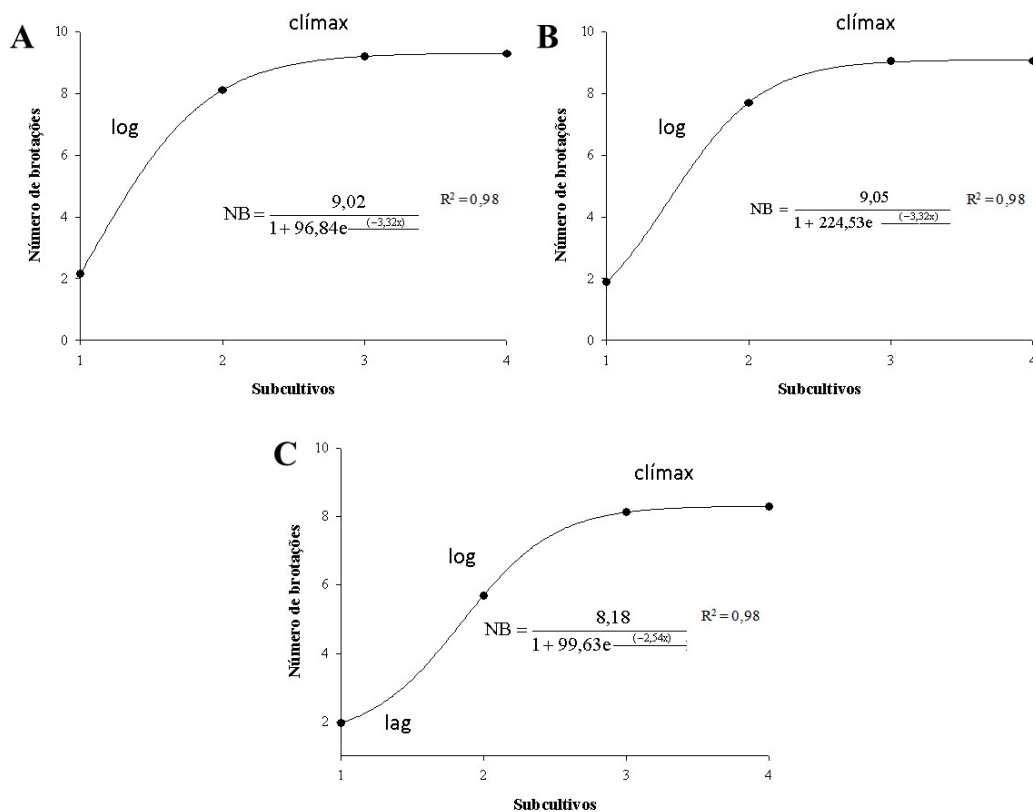
Análises estatísticas

Os dados mensurados foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Lilliefors ($P < 0,05$), seguido pela análise de variância (ANOVA $P < 0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) e, os dados dos fatores quantitativos foram submetidos a análise de regressão polinomial ($P < 0,05$). O software Statistica 7.0 foi utilizado na análise de variância e os parâmetros dos modelos de regressão estimados pelo *software* Curve Expert 1.3 (Hyams 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três meios de cultura avaliados proporcionaram uma taxa *in vitro* de multiplicação e de crescimento similares àqueles reportados na literatura para o gênero *Neoregelia* (Mengarda *et al.* 2009). Porém, não houve diferença significativa no desenvolvimento do número médio de brotações entre os três meios de cultura (MS, ½ MS e WPM), apesar disso, o meio de cultura WPM apresentou uma curva padrão de crescimento com relação ao número de brotações ao longo dos subcultivos evidenciando as fases lag, log e clímax (Fig. 1).

Há evidência de que as brotações no meio de cultura WPM apresentarem um período de adequação ao mesmo, representada pela fase lag, que ocorreu no período inicial



Figs. 1A-C. A. Valores médios do número de brotações (NB) em função do meio de cultura de multiplicação MS; B. Em função do meio de cultura de multiplicação ½ MS; C. Em função do meio de cultura de multiplicação WPM de *Neoregelia johannis* ao longo de quatro subcultivos sucessivos (30 dias cada).

de cultivo. A partir de então, observa-se aumento da taxa de multiplicação das brotações (fase log) até atingir um patamar de estabilização (fase clímax) (Taiz & Zeiger 2013). Dessa forma, explica-se o menor número médio de brotações observado no meio de cultura WPM, o qual apresenta as menores concentrações de nutrientes em relação ao meio de cultura MS, principalmente em relação ao nitrogênio (Fig. 1C).

Nesse contexto, ressalta-se que a concentração de nutrientes do meio de cultura pode influenciar o aumento do número de brotações emitidas, fato também evidenciado na micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich, em qual o número médio de brotações formados no meio MS foi mais elevado em relação ao meio de cultura Knudson (Knudson 1946), sendo este último mais pobre em fontes nitrogenadas (Droste *et al.* 2005).

Em relação ao tamanho e vigor das brotações, verificou-se diversidade nas respostas (Tab. 1, Fig. 2). Os melhores resultados foram obtidos para o meio de cultura MS em sua formulação original. Ao final de 120 dias de cultivo *in vitro*, o meio de cultura MS proporcionou o desenvolvimento predominante de brotações maiores que 2,0 cm (++++) e vigorosas (+++). Os resultados corroboram com aqueles obtidos para a bromélia *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms cultivada em meio de cultura MS e Knudson, onde obteve-se média de 0,2 cm para as brotações cultivadas em meio Knudson, que apresenta menor disponibilidade

Tabela 1. Parâmetros qualitativos das brotações de *Neoregelia johannis* em relação aos meios de cultura (MS, ½ MS e WPM suplementados com 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de BAP) e tempo de cultivo *in vitro* (30, 60, 90 e 120 dias).

Meio de Cultura	Subcultivo (dias)	Tamanho das brotações	Vigor
MS	30	+	+++
	60	++	+++
	90	+++	+++
	120	+++	+++
½ MS	30	+	++
	60	+	++
	90	++	++
	120	++	++
WPM	30	+	++
	60	+	+
	90	+	+
	120	+	+

de nutrientes e 1,2 cm para as cultivadas em meio MS (Naves *et al.* 2003).

As brotações de *N. johannis* subcultivadas em meio de cultura WPM apresentaram desenvolvimento inferior a 1,0 cm (+), com maior homogeneidade, porém brotações menos vigorosas (+) (Fig. 2). Todavia, isso pode ser utilizado de modo favorável, visto que a manutenção ininterrupta em meio MS pode conduzir ao estresse fisiológico das brotações devido ao metabolismo e

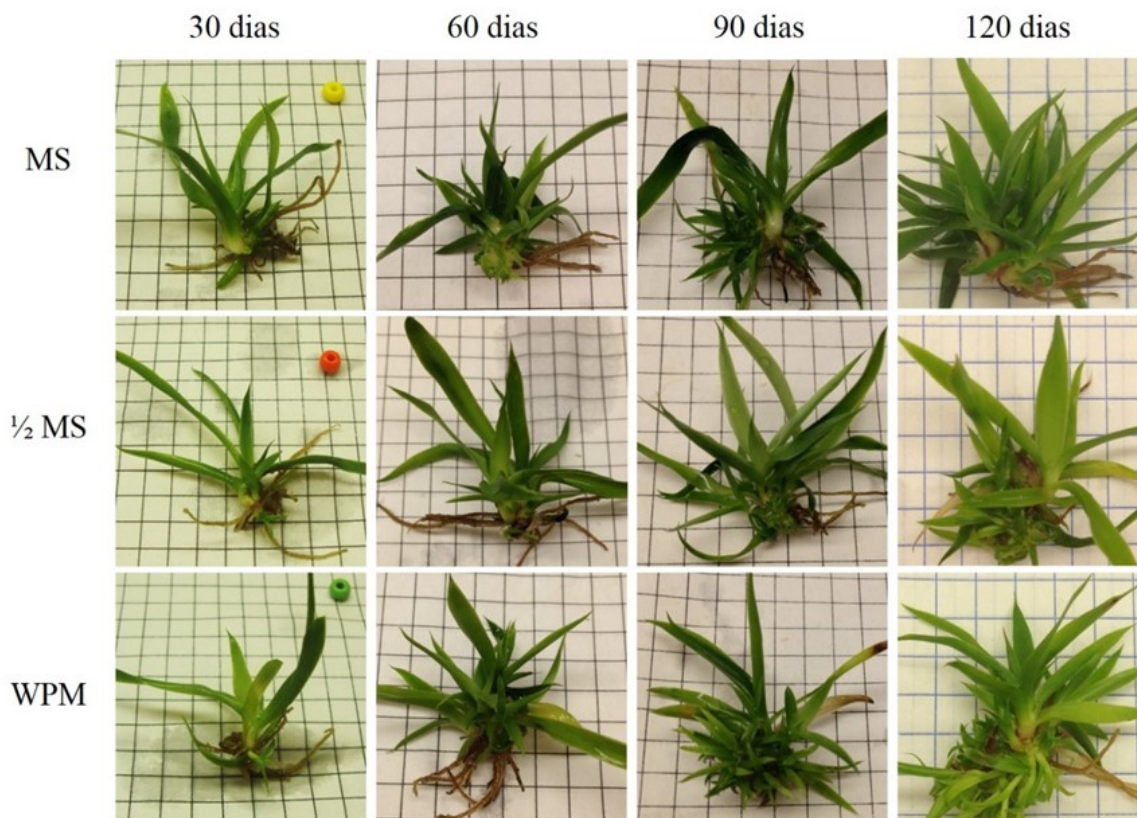


Fig. 2. Desenvolvimento de brotações de *Neoregelia johannis* nos meios de cultura de multiplicação MS, ½ MS e WPM, suplementados com 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de BAP em quatro subcultivos sucessivos (30 dias cada).

crescimento extremamente acelerado promovido por este meio, o que muitas vezes leva a uma intensa manifestação de microrganismos endofíticos inviabilizando a cultura. Dessa forma, alternar dois subcultivos em MS e um em WPM pode ajudar a manter o vigor das brotações a médio e longo prazo, além de ser vantajoso pela não necessidade de re-introdução de material *in vitro* (Borges *et al.* 2011). O mesmo procedimento pode ser adotado para a manutenção de um banco de germoplasma ou para o manejo do cultivo *in vitro* para a produção comercial de mudas, visto que, nesses casos é necessário manter o material vegetal por longos períodos *in vitro*, Graner *et al.* (2019), constatou senescência de material mantido *in vitro* por muito tempo, dessa forma, pode-se utilizar um meio de cultura que não prejudique a multiplicação e que mantém a cultura com o crescimento controlado, neste caso como ocorreu com o WPM. Portanto, a alternância entre os meios de cultura MS e WPM pode ser utilizada para aumentar ou estabilizar o crescimento de *N. johannis*.

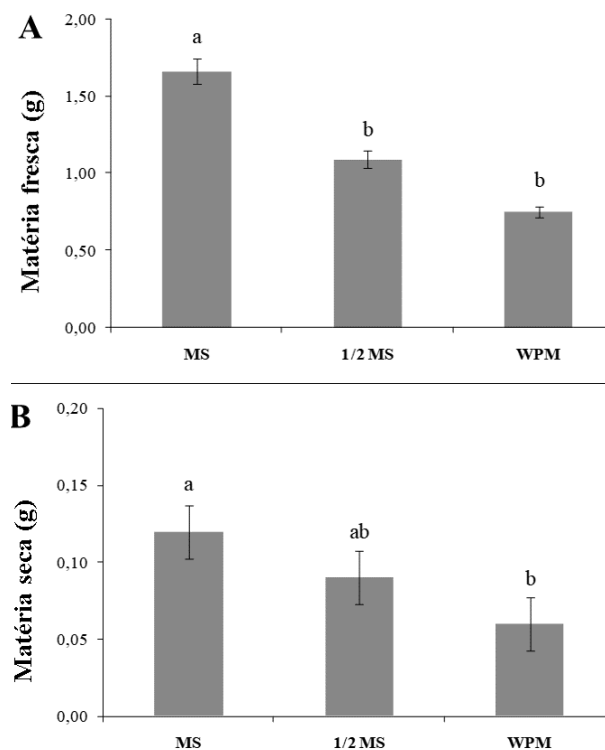
A diferença observada nos parâmetros qualitativos das brotações corroborou com as análises de variância da massa da matéria fresca e da matéria seca. Em relação à massa da matéria fresca, houve diferença apenas em relação ao meio de cultura MS (Fig. 3A). Por outro lado, a análise da massa da matéria seca, evidenciou diferença entre os meios de cultura MS e WPM, não diferindo em relação ao meio 1/2 MS, para o qual os valores encontrados foram intermediários (Fig. 3B). Dessa forma, embora a diluição do meio MS envolva o decréscimo da concentração dos nutrientes, estudos mostraram que o nitrogênio é o principal fator limitante para o crescimento das bromélias (Tamaki *et al.* 2007). O meio de cultura MS por possuir maior disponibilidade de nitrogênio, em função das elevadas concentrações de fontes nitrogenadas, comparativamente aos outros dois meios de cultura avaliados, induz maior produção de metabólitos acarretando a indução e o crescimento de brotações, tamanho das folhas e consequente incremento da massa da matéria fresca e seca das brotações (Fig. 3). Os dados confirmam os resultados obtidos por Ferreira *et al.* (2017) com *Alatiglossum fuscopetalum* (Hoehne) Baptista que também obtiveram maior incremento de matéria seca com o meio de cultura MS seguido pelo meio de cultura 1/2 MS.

Estudos com *Oncidium leucochilum* Bateman ex Lindl e *Vriesea incurvata* mostraram que plantas cultivadas sob deficiência de fósforo e sob 25% da concentração de MS, respectivamente, apresentaram sucesso na aclimatização, dessa forma, o uso do meio de cultura WPM provavelmente não prejudicará a produção de mudas micropropagadas, mesmo estas apresentando menor massa e menor crescimento, nesse caso teremos a mesma quantidade de mudas com menor custo de produção, o que é desejável para uma biofábrica (Silva *et al.* 2014, Sasamori *et al.* 2018).

Os resultados da taxa de crescimento relativo das brotações de *N. johannis* corroboram com a análise da massa da matéria seca. A maior taxa de crescimento relativo

das brotações foi encontrada para o meio MS, seguido pelos meios 1/2 MS e WPM (Tab. 2). Estes resultados também estão de acordo com aqueles observados para os parâmetros qualitativos (Tab. 1) e atribui-se principalmente à maior disponibilidade de fontes nitrogenadas nesse meio de cultura em relação aos meios de cultura 1/2 MS e WPM, conforme discutido anteriormente.

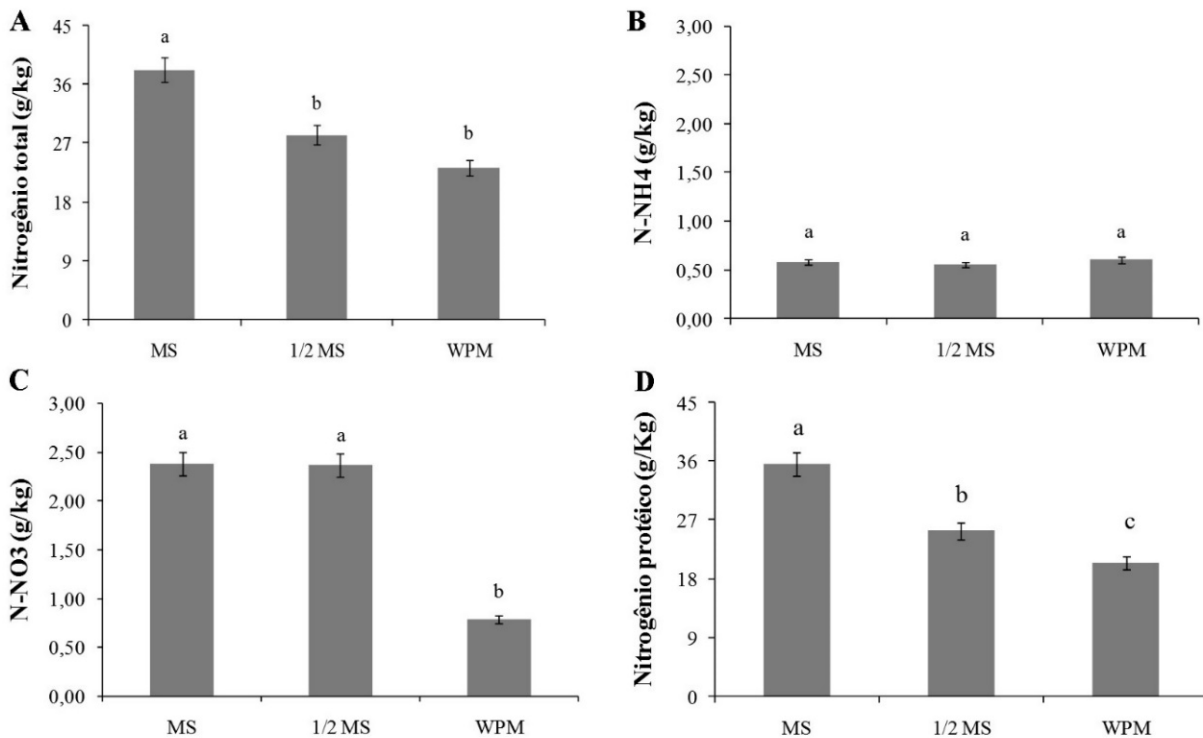
Os resultados obtidos para o teor de nitrogênio total nas brotações evidenciaram que o meio de cultura MS apresentou o maior valor médio, quando comparado aos demais meios de cultura (1/2 MS e WPM) (Fig. 4A). Estes resultados reiteram aqueles encontrados anteriormente, visto que o meio de cultura MS, em sua formulação original, apresenta maior disponibilidade de fontes nitrogenadas em relação aos meios de cultura 1/2 MS e WPM. Os resultados são suportados e estão de acordo com o estudo de Kurita & Tamaki (2014), onde os autores constataram que para a



Figs. 3A-B. A. Valores médios da massa da matéria fresca; B. Valores médios da massa da matéria seca de brotações de *Neoregelia johannis* ao final de quatro subcultivos sucessivos (30 dias cada) em função dos meios de cultura de multiplicação MS, 1/2 MS e WPM suplementados com 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de BAP. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey

Tabela 2. Taxa de crescimento relativo (%) da produção de matéria seca em brotações de *Neoregelia johannis* na multiplicação *in vitro* nos meios de cultura MS, 1/2 MS e WPM suplementados com 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de BAP.

Meio de cultura	R%
	<i>Neoregelia johannis</i>
MS	0,39
1/2 MS	0,14
WPM	0,01



Figs. 4A-D. A. Valores médios para os teores de nitrogênio total; B. nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺); C. nitrogênio nítrico (N-NO₃⁻); D. nitrogênio proteico em brotações de *Neoregelia johannis* ao final de quatro subcultivos sucessivos (30 dias cada) em função dos meios de cultura de multiplicação MS, ½ MS e WPM suplementados com 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de BAP. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

bromélia *A. imperialis*, o incremento de nitrogênio no meio de cultura promove o aumento endógeno deste elemento, sendo observado o maior acúmulo no meio de cultura MS.

Os resultados das análises, para o teor de nitrogênio fracionado, evidenciaram que os valores médios baixos para o teor de nitrogênio amoniacal nas brotações não diferiram entre os tratamentos testados (Fig. 4B). Muito provavelmente, este resultado está relacionado ao próprio metabolismo do nitrogênio em plantas, visto que o acúmulo do íon amônio (NH₄⁺) é prejudicial à fisiologia do vegetal, podendo levar a morte e, por este motivo deve ser rapidamente assimilado em sua forma orgânica (Taiz & Zeiger 2013).

Por outro lado, os resultados das análises realizadas para o teor de nitrogênio nítrico nas brotações evidenciaram que o valor médio obtido para o meio de cultura WPM foi consideravelmente inferior àqueles observados para os demais meios de cultura (MS e ½ MS) (Fig. 4C), o que se justifica pela menor disponibilidade desse nutriente em sua formulação. Tamaki *et al.* (2007) observaram que explantes de *Ananas comosus* (L) Merr. mantidos em diferentes diluições de macronutrientes do meio MS, apresentaram maior teor de nitrato nos explantes cultivados em meio de cultura MS e diminuiu cerca de 50% no meio de cultura ½ MS, fato este não verificado em nossos resultados, visto que os explantes mantidos em meio de cultura MS e ½ MS não apresentaram diferenças no teor de nitrato, diferença essa que pode ser entendida, pelo fato dessas duas espécies

pertencerem à gêneros com distintos hábitos (terrestre e epífita).

Os dados obtidos na análise para determinação do teor de nitrogênio proteico nas brotações evidenciaram que os valores médios entre os três tratamentos analisados diferiram entre si. Os valores corresponderam à concentração de nitrogênio disponível no meio de cultura, ou seja, o maior valor foi observado nas brotações mantidas em meio de cultura MS, seguido pelo ½ MS e WPM com os menores valores (Fig. 4D). Dessa forma, apesar da análise de nitrogênio nítrico não ter apresentado diferença entre os meios de cultura, a análise de nitrogênio proteico revelou que a maior disponibilidade de fontes nitrogenadas no meio MS possibilitou maior formação de proteínas, elevando o acúmulo das mesmas.

Em consideração a todos os parâmetros analisados, observou-se que o meio de cultura MS promoveu maior crescimento das brotações, obtendo os valores mais elevados da massa de matéria fresca e seca, além da maior taxa de crescimento relativo (Fig. 3; Tab. 2). As brotações desenvolvidas em meio de cultura MS se mostraram muito vigorosas (Tab. 1), corroborando com as análises de nitrogênio total e fracionado, onde observou-se a maior produção de proteínas em relação às brotações desenvolvidas nos outros meios de cultura testados (½ MS e WPM) (Fig. 4).

Ressalta-se que o uso de meio de cultura líquido favorece a absorção dos nutrientes pelas escamas, visto

que as folhas estão em maior contato com o meio de cultura, o que não ocorre no meio sólido, quando apenas as raízes e eventualmente a região abaxial das folhas estão em contato com o meio (Benzing 2000). Diversos trabalhos têm mostrado o melhor desenvolvimento de espécies de bromélias em meio líquido (Martins *et al.* 2015, Guerra *et al.* 1999), todavia, nem sempre os resultados são superiores ao uso do meio de cultura sólido para as espécies de bromélias, como ocorreu para as espécies *Nidularium innocentii* Lem. e *Nidularium procerum* Lindm., onde os resultados obtidos não apresentam interação significativa para o fator consistência de meio de cultura (Silva *et al.* 2012).

De modo geral, os melhores resultados encontrados em meio líquido devem ocorrer provavelmente pela presença das escamas na região adaxial das folhas que ficam em contato direto com o meio de cultura líquido, favorecendo a absorção e metabolização dos nutrientes. Freschi *et al.* (2010) revelaram que as folhas de *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez apresentam uma elevada complexidade fisiológica em relação a absorção e metabolização de água e nutrientes, o que indica uma elevada capacidade de adaptação nutricional. Além disso, Takahashi & Mercier (2011) verificaram a existência de uma divisão na absorção de nitrogênio e assimilação de amônio nas folhas de *V. gigantea*, o que permite uma otimização do processo de absorção e assimilação resultando numa maior eficiência e garantindo que grande parte do nitrogênio disponível no tanque seja rapidamente metabolizado. Outro aspecto a ser considerado é que neste trabalho não foram utilizadas nenhuma forma de ponte, ou seja, as brotações ficaram parcialmente submersas mantendo contato direto com o meio e favorecendo a absorção de nutrientes.

Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo estabelecem um protocolo eficiente de multiplicação *in vitro* de brotações de *N. johannis*, o que é de particular importância para a espécie. Além disso, corrobora o uso da técnica de cultivo *in vitro* em meio líquido como alternativa viável tanto para a produção quanto para a conservação *in vitro* de genótipos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo pela infraestrutura e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

REFERÊNCIAS

- Benzing, D.H. 2000. Bromeliaceae. Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 690p.
- The Brazil Flora Group - BFG 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66(4):1085-1113. 10.1590/2175-7860201566411
- Borges, Silvano Rodrigues, Xavier, Aloisio, Oliveira, Leandro Silva de, Lopes, Aline Pontes, & Otoni, Wagner Campos. 2011. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Árvore* 35(2):173-182. 10.1590/S0100-67622011000200001
- Caldas, L.S., Haridasan, P. & Ferreira, M.E. 1998. Meios nutritivos. *In Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (A.C. Torres, L.S. Caldas, J.A. Buso, eds.). Embrapa, Brasília, Distrito Federal p. 37-64.
- Carneiro, L.A., Araújo, R.F.G, Brito, C.J.M., Fonseca, M.H.P.B., Costa, A. & Crococo, O.J. 1999. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham). L. B. Smith, an endemic bromeliad from eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:79-83.
- Coxson, D.S. & Nadkarni, N.M. 1995. Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest ecosystems. *In Forest canopies* (M.D. Lowman & N.M. Nadkarni, eds.). Academic Press, California, p. 495-543.
- Dal Vesco, L.L., Pescador, R., Corredor, J.P., Welter, L.J. & Guerra, M.P. 2014. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 36:271-278.
- Droste, A., Silva, A.M., Matos, A.V. & Almeida, J.W. 2005. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48(5):717-722.
- Ferreira, W.M., Vasconcelos, M.C., Silva, C.C.N., Oliveira, H.R. & Suzuki, R.M. 2017. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. *Iheringia. Série Botânica* 72(1):57-65. 10.21826/2446-8231201772106
- Freschi, L., Takahashi, C.A., Cambui C.A., Semprebom, T.R., Cruz, A.B., Mioto P.T, Versieux, L.M., Calvente, A., Latansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P.M. & Mercier, H. 2010. Specific leaf are a soft tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology* 167:526–533.
- Gonçalves, A. Z., Mercier, H., Oliveira, R.S. & Romero, G.Q. 2016. Trade-off between soluble protein production and nutritional storage in Bromeliaceae. *Annals of Botany* 118:1199-1208. 10.1093/aob/mcw174
- Graner, E.M, Calderan-Meneghetti, E, Leone, G.F, de Almeida, C.V, de Almeida, M. 2019. Long-term *in vitro* culture affects phenotypic plasticity of *Neoregelia johannis* plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 137(3), 511-524. 10.1007/s11240-019-01586-7
- Gribble, K., Conroy, J.P., Holford, P. & Milham, P.J. 2002. *In vitro* uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. *Australian Journal of Botany* 50: 713-723.
- Guerra M.P., Dal Vesco L.L., Pescador R., Schuelter A.R. & Nodari R.O. 1999. Establishment of a regenerative protocol for the pineapple micropropagation. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:1557–1563.
- Hunt, R. 1982. Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold, London. 248p.
- Hyams D.G. 2005. Curve Expert Version 1.37. A comprehensive curve fitting package for Windows.
- Inselsbacher, E., Cambui, C.A., Richter, A., Stange, C.F. & Mercier, H. 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist* 175:311-320.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 14:214-217.
- Kurita, F.M.K. & Tamaki, V. 2014. *In vitro* growth of the bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms with different concentrations of nitrogen. *Acta Scientiarum, Biological Sciences* 36(3):279-285.
- Lloyd, G. & McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society*, 30:421-427.
- Luther, H.E. 2012. An alphabetical list of bromeliad binomials. 13th edition. Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota, 114p.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & de Oliveira, S.A. 1987. Avaliação do Estado nutricional das Plantas; princípios e aplicações. Editora POTAFOS, Piracicaba, SP, 319p.
- Martinelli, G., Vieira, C.M., Gonzalez, M., Leitman, P., Piratininga, A., Costa, A.F. & Forzza, R.C. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59(1):209-258.

- Martins, J.P.R.; Pasqual, M.; Martins, A.D. & Ribeira, S.F. 2015. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). *Australian Journal of Crop Science* 9: 85-91.
- Mengarda, L.H.G., Povoas, L. Debiasi, C. & Pescador, R. 2009. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. *Scientia Agraria* 10(6):469-474.
- Mercier, H., Kerbauy, G. B., Sotta, B. & Miginiac, E. 1997. Effects of NO_3^- , NH_4^+ and ureia nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. *Plant, Cell and Environment* 20:387-392.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Naves, V.C., Paiva, P.D., Paiva, R., Pasqual, M. & Paiva, L.V. 2003. Avaliação de diferentes concentrações dos meios de cultura MS e Knudson para propagação *in vitro* da bromélia-imperial. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 9(2):161-166.
- Oberschelp, G.P.J & Gonçalves, A.N. 2016. Assessing the effects of basal media on the *in vitro* propagation and nutritional status of *Eucalyptus dunnii*. Maiden *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52:28-37 10.1007/s11627-015-9740-7
- Paula, C.C. 2001. Cultivo prático de bromélias. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 73p.
- Ramage, C.M. & Williams, R.R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 38:115-124.
- Sasamori, M.H., Júnior, D.E. & Droste, A. 2018. *In vitro* propagation of *Vriesea incurvata*: conservation of a bromeliad endemic to the Atlantic Forest. *Iheringia, Série Botânica* 73(2):151-158. 10.21826/2446-8231201873207
- Sasamori, M.H., Júnior, D.E. & Droste, A. 2016. Baixas concentrações de macronutrientes beneficiam a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, Brasil. *Rodriguésia* 67(4):1071-1081. 10.1590/2175-7860201667417
- Silva, A.L.L., Costa, J.L., Alcantara, G.B., Carvalho, D.C., Schuck, M.R., Biasi, L.A., Scheidt, G.N. & Soccol, C.R. 2012. Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany* 44(3): 1095-1101.
- Silva, A.L.L., Costa, J.L., Gollo, A.L., Santos, J.D., Forneck, H.R., Biasi, L.A., soccol, V.T., Carvalho, J.C. & Soccol, C.R. 2014. Development of a vinasse culture medium for plant tissue culture. *Pakistan Journal of Botany* 46(6): 2195-2202.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2013. *Fisiologia Vegetal*. Artmed, Porto Alegre. 918 p
- Takahashi, C.A. & Mercier, H. 2011. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology* 168:1208-1216.
- Tamaki, V., Mercier, H. & Nievola, C.C. 2007. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. *Hoehnea* 34(1):69-73.