

Petrolina, PE / Agosto, 2025

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL



Estabelecimento e organogênese in vitro de *Cryptanthus bahianus*

Juliana Martins Ribeiro⁽¹⁾, Nataniel Franklin de Melo⁽¹⁾⁽¹⁾Pesquisador(a), Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

Resumo – Com o objetivo de estabelecer e multiplicar *Cryptanthus bahianus* in vitro, foram testados diferentes tipos de tratamento prévio das plantas matrizes, composições de meio de cultura e tipos de explantes. Os tratamentos prévios das plantas matrizes consistiram da aplicação de cloridrato de kasugamicina e mancozebe, ambos na concentração de 1%, das seguintes maneiras: 1) uma aplicação de cloridrato de kasugamicina na semana da instalação dos experimentos; 2) uma aplicação semanal de cloridrato de kasugamicina, 1 mês antes da instalação dos experimentos e 3) duas aplicações semanais de mancozebe, 2 meses antes da instalação do experimento. Os meios testados para a proliferação das gemas foram meio MS 1) sem reguladores vegetais, 2) adicionado de 2,5 mg L⁻¹ de BAP e 3) adicionado de 1,5 mg L⁻¹ de BAP. Para a organogênese direta, empregou-se o meio MS adicionado de 4,95 mg L⁻¹ de BAP. Para a indução de organogênese indireta, via calogênese, os meios testados foram meio MS 1) adicionado de 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2) contendo 0,2 mg L⁻¹ de AIB e 0,02 mg L⁻¹ de BAP. Os tipos de explantes testados foram 1) base da folha, 2) meio da folha, 3) talo, 4) raízes e 5) gemas presentes nas axilas das folhas. Os resultados mostraram que o tratamento prévio das plantas matrizes com cloridrato de kasugamicina, na concentração 1%, pode ser realizado para a redução da contaminação no estabelecimento in vitro desta espécie; o meio MS adicionado de 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D induz a calogênese e o meio MS adicionado de 1,5 mg L⁻¹ de BAP induz a brotações em calos obtidos a partir de tecidos de base de folhas de *C. bahianus*.

Termos para indexação: bromélias, micropropagação, explantes, contaminação, oxidação.

In vitro establishment and organogenesis of *Cryptanthus bahianus*

Abstract – Aiming at in vitro establishment and multiplication of *Cryptanthus bahianus*, different types of pretreatment of mother plants, culture medium compositions and types of explants were tested. The previous treatments of the mother plants consisted of the application of kasugamycin hydrochloride and mancozeb, both at a concentration of 1%, in the following ways: 1) an application of kasugamycin hydrochloride in the week of the installation of the experiments; 2) one weekly application of kasugamycin hydrochloride, one month before the installation of the experiments and 3) two weekly applications of mancozeb, two months before the installation of the experiment. The media

Embrapa Semiárido
 Rodovia BR-428, Km 152, Zona Rural – Caixa Postal 23
 56302-970 - Petrolina, PE
<https://www.embrapa.br/semiárido>
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Carlos Alberto Tuão Gava

Secretária-executiva

Juliana Martins Ribeiro

Membros

Amadeu Regitano Neto, Flávio de

França Souza, Geraldo Milanez

de Resende,

Gislene Feitosa Brito

Gama, Maria Angélica Guimarães

Barbosa, Pedro Martins

Ribeiro Júnior, Rita Mércia

Estigarribia Borges, Salete Alves

de Moraes, Sérgio Guilherme de

Azevedo,

Sidinei Anunciação Silva, Viséldo

Ribeiro de Oliveira

Edição executiva

Sidinei Anunciação Silva

Revisão de texto

Sidinei Anunciação Silva

Normalização bibliográfica

Sidinei Anunciação Silva

(CRB-4/1721)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Sidinei Anunciação Silva

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

tested for bud proliferation were MS medium 1) without growth regulators, 2) added with 2.5 mg L⁻¹ of BAP and 3) added with 1.5 mg L⁻¹ of BAP. For direct organogenesis, it consists of MS medium added with 4.95 mg L⁻¹ of BAP. For the induction of indirect organogenesis, via callogenesis, the media tested were MS medium 1) added with 1.105 mg L⁻¹ of 2,4-D and 2) containing 0.2 mg L⁻¹ of IBA and 0.02 mg L⁻¹ BAP. The types of explants tested were 1) leaf base; 2) middle of the sheet; 3) stalk; 4) roots and 5) buds present in the leaf axils. The results showed that the prior treatment of mother plants with kasugamycin hydrochloride, at a concentration of 1%, can be used to reduce contamination in the establishment of this species in vitro; the MS medium added with 1.105 mg L⁻¹ of 2,4-D induces callogenesis; and the MS medium added with 1.5 mg L⁻¹ of BAP induces shoots in calli obtained from base tissues of *C. bahianus*.

Index terms: bromeliads, micropropagation, explants, contamination, oxidation.

Introdução

O Semiárido brasileiro tem a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação adaptada às condições de aridez, com formas variadas, denominada Caatinga (Silva et al., 2010). As plantas nativas da Caatinga, além de sua beleza, apresentam baixa demanda por água, características importantes que podem ser exploradas para o uso ornamental destas espécies, considerando o crescimento da cadeia produtiva de plantas e flores ornamentais nos últimos anos no País (Kiill et al., 2019).

O gênero *Cryptanthus*, pertencente à família Bromeliaceae e à subfamília Bromelioideae, compreende cerca de 60 espécies endêmicas no Brasil, quatro delas com ocorrência no bioma Caatinga (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020). *Cryptanthus bahianus* L.B. Sm. (Bromeliaceae) é uma espécie de bromélia que apresenta potencial para a geração de renda no Semiárido, a partir do cultivo comercial, considerando sua rusticidade e beleza (Figura 1). Entretanto, poucas são as informações na literatura que fornecem subsídios para o manejo de espécies vegetais nativas da Caatinga com potencial de uso ornamental, incluindo *Cryptanthus* spp.

No entanto, o uso inadequado e insustentável dos recursos naturais e a exploração desordenada de espécies nativas, têm contribuído para a diminuição de exemplares nos locais de ocorrência natural, assim como a diminuição da variabilidade genética de diversas espécies deste ecossistema (Bustamante et al., 2019). Uma alternativa para atenuar a perda de recursos genéticos pelo extrativismo, seria

a manutenção in vitro do germoplasma de interesse, tanto para sua conservação, quanto subsídio para o incentivo ao desenvolvimento de cadeias produtivas. No entanto, não existem informações disponíveis na literatura a respeito do cultivo in vitro de *C. bahianus*, havendo apenas relatos do uso desta técnica para outras espécies do gênero *Cryptanthus* (Carneiro et al., 1998; Arrabal et al., 2002) ou sobre outras espécies de gêneros distintos (Huang et al., 2011; Lima et al., 2012; Bastos et al., 2016; Dias et al., 2020; Garcia et al., 2021). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer, sob condições de cultivo in vitro, dois genótipos de *C. bahianus*, em diferentes composições de meios de cultura.



Fotos: Juliana Martins Ribeiro

Figura 1. Folhas e flor de *Cryptanthus bahianus* cultivada em vaso de 19 cm de diâmetro de boca.

Este trabalho se alinha aos esforços da agenda dos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS), da Organização das Nações Unidas (ONU), mais precisamente com o objetivo 2, meta 2.5, que trata da manutenção da diversidade genética de sementes, plantas cultivadas, animais de criação e domesticados e suas respectivas espécies selvagens, inclusive por meio de bancos de sementes e plantas diversificados (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

As avaliações foram realizadas considerando o tratamento prévio das plantas matrizes em casa de vegetação, utilizando fungicidas e bactericidas comerciais; o tempo de contato das plantas com o agente descontaminante, no qual as plantas inteiras foram imersas em solução de hipoclorito de sódio por diferentes períodos de tempos, em uma etapa anterior ao trabalho no interior da capela de fluxo laminar; o tipo de explante adequado; e a composição do meio nutritivo para o estabelecimento da cultura in vitro, considerando a indução de proliferação de gemas, organogênese direta e indireta. (Tabela 1). Os três experimentos foram realizados utilizando plantas marrons e verdes como doadoras de explantes, e serão detalhados a seguir.

Plantas matrizes de *C. bahianus*, mantidas em casa de vegetação da Embrapa Semiárido, foram submetidas a diferentes tipos de tratamento prévio

à introdução in vitro, visando diminuir ou eliminar a contaminação in vitro, divididas em três experimentos: 1) fungicida e bactericida contendo cloridrato de kasugamicina como princípio ativo, na concentração de 1%, com uma aplicação na semana de instalação do experimento (uma aplicação no total); 2) fungicida e bactericida contendo cloridrato de kasugamicina como princípio ativo, na concentração de 1%, administrados 1 mês antes da instalação do experimento in vitro, com aplicação semanal do

produto (quatro aplicações no total); 3) fungicida contendo mancozebe como princípio ativo, na concentração de 1%, administrado 2 meses antes da instalação do experimento in vitro, com duas aplicações semanais do produto (16 aplicações no total). Após a realização dos tratamentos na casa de vegetação, as plantas matrizes foram levadas para o Laboratório de Biotecnologia (9.072047,-40.319683) para o início dos procedimentos de assepsia e estabelecimento in vitro.

Tabela 1. Experimentos conduzidos para o estabelecimento in vitro de *Cryptanthus bahianus*.

Experimento	Tratamento na casa de vegetação	Tratamento com hipoclorito de sódio	Tipo de explante	Meio de cultura
1	Uma aplicação de cloridrato de kasugamicina (1%)	Imersão das plantas em solução de hipoclorito de sódio 10% (v/v) por 1 minuto	Proliferação de gemas: Gemas axilares de folhas	Proliferação de gemas: MS + 2,5 mg L ⁻¹ de BAP
2	Quatro aplicações de cloridrato de kasugamicina (1%)	Imersão das plantas em solução de hipoclorito de sódio 10% (v/v) por 5 minutos	Proliferação de gemas: talo Organogênese direta: base da folha Organogênese indireta: base e meio da folha, e raízes	Proliferação de gemas: MS sem reguladores Organogênese direta: MS + 4,95 mg L ⁻¹ de BAP Organogênese indireta: MS + 1,105 mg L ⁻¹ de 2,4-D
3	16 aplicações de mancozebe (1%)	Imersão das plantas em solução de hipoclorito de sódio 10% (v/v) + Tween, durante 15 minutos	Proliferação de gemas: talo e gemas axilares de folhas Organogênese indireta: base e meio da folha, e raízes	Proliferação de gemas: MS sem reguladores e MS + 1,5 mg L ⁻¹ de BAP Organogênese indireta: MS + 0,2 mg L ⁻¹ de AIB e 0,02 mg L ⁻¹ de BAP

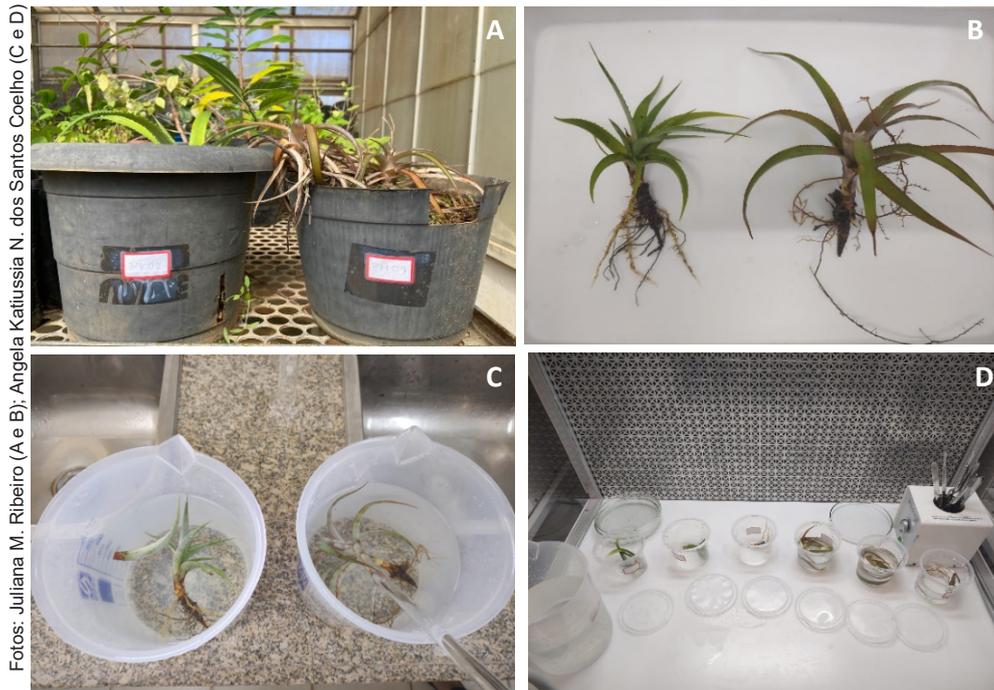
Inicialmente, os vasos foram identificados, para que pudesse ser realizada a rastreabilidade do explante em relação à planta matriz da qual estes foram extraídos (Figura 2A). Os exemplares foram separados em plantas verdes (PV) e plantas marrons (PM), colocando-se os números em ordem crescente. Como foram utilizados três vasos de cada, as identificações foram as seguintes: PV01, PV02, PV03, PM01, PM02 e PM03.

Logo após, uma planta de cada vaso foi retirada e lavada em água corrente para retirada do excesso de terra das raízes e demais resíduos (Figura 2B). Em seguida, as plantas foram lavadas em solução de Tween 20 (10 gotas por 1,5 L) e enxaguadas em água corrente. No experimento 1, as plantas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 10% (v/v), por 1 minuto, e no experimento 2 durante 5 minutos (Figura 2C). No experimento 3, as plantas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 10% (v/v), adicionada de 10 gotas de Tween 20 por 1,5 litro de solução, durante 15 minutos. As plantas dos três experimentos foram enxaguadas por três

vezes em água destilada autoclavada e, finalmente, levadas para a capela de fluxo laminar. No interior da capela de fluxo laminar, as folhas foram destacadas das plantas e os explantes foram divididos em diferentes tipos, tanto para plantas verdes (PV) quanto as marrons (PM) (Figura 2D).

No experimento 1, foram utilizados como explantes gemas presentes nas axilas das folhas. No experimento 2, foram utilizados quatro tipos de explantes, sendo eles: 1) base da folha; 2) meio da folha; 3) talo e 4) raízes. No experimento 3, foram utilizados cinco tipos de explantes, sendo eles: 1) base da folha; 2) meio da folha; 3) talo; 4) raízes e 5) gemas presentes nas axilas das folhas (Figura 3).

No interior da capela de fluxo laminar, os diferentes explantes foram imersos em solução de etanol a 70% durante 1 minuto, sendo em seguida transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v), onde permaneceram sob agitação contínua durante 20 minutos. Ao final, foram realizados três enxágues em água ultrapura autoclavada.



Fotos: Juliana M. Ribeiro (A e B); Angela Katiussia N. dos Santos Coelho (C e D)

Figura 2. Identificação dos vasos contendo as plantas matrizes de *Cryptanthus bahianus* para o estabelecimento dos explantes in vitro (A), plantas verdes e marrons extraídas e higienizadas em água corrente para a retirada do excesso de terra das raízes e demais resíduos das plantas (B), plantas submersas em solução de hipoclorito 10% (v/v) (C) e desinfestação dos explantes no interior da capela de fluxo laminar (D).

Para os experimentos 1, 2 e 3, os meios de cultura utilizados no estabelecimento dos explantes foi composto pela formulação de sais inorgânicos MS (Murashige; Skoog, 1962), vitaminas de White (1943), 0,002 g/L de glicina, 0,1 g/L de inositol, 30 g/L de sacarose, 6,5 g/L de ágar, sendo o pH aferido para 5,9 e o meio esterilizado por autoclavagem (121 °C e 1 kg/cm² durante 20 minutos).

No experimento 1, foram adicionados 2,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) ao meio de cultura, visando a proliferação das gemas axilares. No experimento 2, os meios testados foram elaborados com o objetivo de induzir a proliferação de gemas e organogênese direta e indireta nos diferentes tipos de explantes. Para a proliferação de gemas, foram testados meio MS líquido, sem reguladores vegetais, nos explantes classificados como talos. Para a organogênese direta no tipo de explante base da folha, utilizou-se meio MS adicionado de 4,95 mg L⁻¹ de BAP. Para a indução de organogênese indireta nos explantes base e meio de folhas e explantes de raízes, o meio MS foi adicionado de 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

No experimento 3, os explantes foram imersos em uma solução de 10% de ácido ascórbico e, em seguida, introduzidos nos meios de cultura. Os meios testados foram elaborados com o objetivo de induzir a proliferação de gemas e organogênese indireta nos diferentes tipos de explantes. Para a proliferação de gemas, foram testados meio MS líquido, sem reguladores vegetais, nos explantes classificados como talos, e meio MS adicionado de 1,5 mg L⁻¹ de BAP, no tipo de explante gema axilar. Para a indução de organogênese indireta, o meio MS foi adicionado de 0,2 mg L⁻¹ de AIB (ácido

Ilustração: Juliana Martins Ribeiro

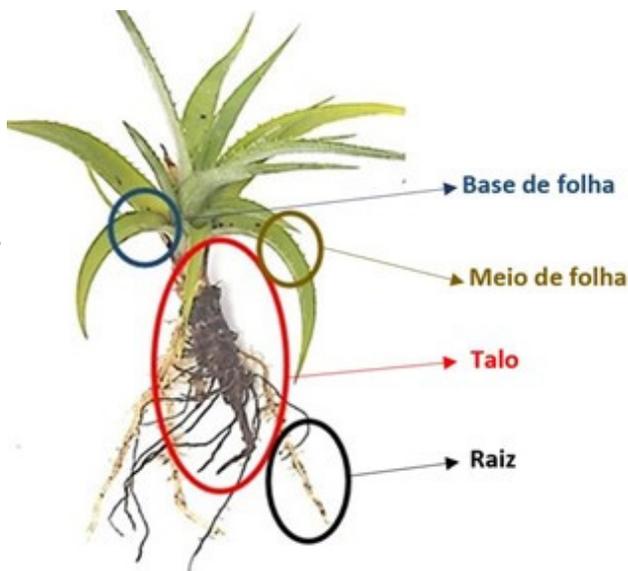


Figura 3. Diferentes tipos de explantes utilizados no estabelecimento in vitro de *Cryptanthus bahianus*.

indolbutírico) e 0,02 mg L⁻¹ de BAP, nos explantes base e meio de folhas e explantes de raízes.

Após a introdução no meio de cultura adequado, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, radiação fotossintética ativa de 40 μmol.m^{-2s-1} e fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação, oxidação e de reação dos explantes, 30 dias após a introdução dos explantes in vitro.

Resultados e discussão

A fase de estabelecimento da cultura asséptica in vitro é uma das mais críticas da cultura de tecidos vegetais in vitro, pois, deve haver a eliminação das contaminações por fungos e bactérias e, ao mesmo tempo, a manutenção de altos índices de sobrevivência e de desenvolvimento dos explantes. De um lado, o aumento da concentração do agente

desinfetante e o tempo de contato com os explantes pode reduzir as contaminações, mas, por outro lado, pode diminuir a sobrevivência e, consequentemente, o desenvolvimento dos explantes in vitro. Dessa forma, é importante otimizar o tipo e concentração do agente desinfetante, bem como o tempo de contato com os explantes.

Além do controle das contaminações, na fase de estabelecimento da cultura in vitro é importante controlar a oxidação, pois este processo também pode resultar na morte dos explantes (Singh; Singh, 2018).

No experimento 1, 100% do material foi perdido por contaminação (dados não apresentados). Nos experimentos 2 e 3, foram tomados dados relacionados com a porcentagem de explantes contaminados e oxidados, decorridos 30 da instalação do experimento (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de contaminação e oxidação em função do tratamento prévio das matrizes, do tipo de explante e do tratamento com a solução antioxidante, decorridos 30 dias de instalação do experimento. Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

Tipo de explante	Contaminação		Oxidação	
	Cloridrato de kasugamicina 1%	Mancozebe	Sem ácido ascórbico	Ácido ascórbico 10%
Talo	100%	100%	--	--
Base da folha	34,4%	68,7%	46,9%	31,2%
Meio da folha	20,4%	37,7%	79,5%	50%
Raiz	68,7%	62,5%	0	0
Gema axilar	--	100%	--	--

Em relação à porcentagem de contaminação, foram observados maiores percentuais nos explantes dos tipos talo, base de folha, gemas axilares e raiz. Tal fato pode ser atribuído à sua anatomia e ao local de desenvolvimento. Os explantes do tipo talo, apesar de apresentarem alto potencial para a proliferação das gemas presentes nas axilas das folhas, possuem uma anatomia que favorece contaminações. Os explantes do tipo base de folha e gemas axilares ficam localizados em contato direto com o talo, que são locais mais protegidos da planta, de mais difícil contato com o agente desinfetante. Já os explantes do tipo raiz, por ficarem em contato com o solo e sua microbiota, também estão mais propensos a contaminações, tanto por bactérias quanto por fungos.

O cloridrato de kasugamicina é um fungicida e bactericida sistêmico, utilizado no controle de diversas doenças, em ampla variedade de culturas. Quando pulverizado na parte aérea das plantas, é absorvido e redistribuído no limbo foliar (Theodoro; Maringoni, 2000). Esse produto foi utilizado de

forma eficiente para o controle de contaminações no estabelecimento in vitro de um híbrido de *Grandularia*. Plantas matrizes do híbrido de *Grandularia* (*G. peruviana* x *G. scrobiculata*) foram borrifadas três vezes, a cada 2 dias, com uma solução contendo 2,5 ml L⁻¹ do produto (González et al., 2015). Da mesma forma, o prévio tratamento fitossanitário de faveleira (*Cnidoscylus quercifolius* Pohl) com o cloridrato de kasugamicina foi eficiente na redução da contaminação in vitro. Plantas matrizes foram borrifadas uma vez por semana, durante 4 semanas, com uma solução na concentração de 1% do produto (Ribeiro et al., 2022).

Não houve redução da contaminação com a utilização do mancozebe na concentração de 1% (Tabela 1). As aplicações com este produto foram realizadas duas vezes por semana, durante 2 meses, ou seja, quatro vezes mais, quando comparadas com o número de aplicações com o cloridrato de kasugamicina na mesma concentração.

O mancozebe é um fungicida agrícola não sistêmico, com ação protetora multissítio em contato, ou

seja, permanece sobre a superfície foliar e atua formando uma camada de proteção contra a germinação de esporos (Rosa; Marques, 2011). O cloridrato de kasugamicina é um fungicida e bactericida sistêmico, fato que pode ter contribuído para que este, mesmo com um número de aplicações inferior ao adotado para o mancozebe, tenha tido resultado semelhante a este último no controle da contaminação dos explantes *in vitro*. Este produto foi utilizado de forma eficiente no controle das contaminações durante o estabelecimento *in vitro* de *Cryptanthus sinuosus*. Para tal propósito, plantas matrizes foram submetidas a três aplicações semanais, durante 6 semanas, com uma solução de mancozebe na concentração de 1% (Carneiro et al., 1998).

Em relação à porcentagem de oxidação, foram observados maiores percentuais nos explantes dos tipos base e meio de folha, quando comparados com o tipo de explante raiz, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Tal fato pode ser atribuído à maior extremidade das superfícies com lesão física nos explantes de folha, em comparação com os explantes de raízes (Tabela 2).

O processo de oxidação ocorre em consequência da liberação de compostos fenólicos, decorrente da lesão física no tecido vegetal. A degradação oxidativa dos compostos fenólicos liberados, além do escurecimento do meio de cultura e dos tecidos, pode resultar na necrose ou morte do explante (Singh; Singh, 2018).

Durante o estabelecimento *in vitro* de hortelã (*Mentha piperita* L.), foi observado que a porcentagem de oxidação foi maior em explantes de segmentos foliares quando comparada com aquela relacionada aos segmentos nodais (Lattuada et al., 2019). Da mesma maneira, segundo Ribeiro et al. (2022), explantes de segmentos nodais apresentaram menores percentuais de oxidação, quando comparados com aqueles oriundos de segmentos de folhas, utilizados no estabelecimento *in vitro* de faveleira (*Cnidoculus quercifolius* Pohl) (Euphorbiaceae).

Os resultados mostraram ter havido redução da oxidação com a imersão dos explantes em uma solução de ácido ascórbico 10%, aos 30 dias de instalação do experimento 3 (Tabela 2). O ácido ascórbico é capaz de eliminar radicais de oxigênio que são produzidos quando há lesão física do tecido e, desta forma, atuar na inibição ou prevenção do processo de oxidação (Ndakidemi et al., 2014), e já se mostrou eficiente na redução da oxidação durante o estabelecimento *in vitro* de diferentes espécies.

O ácido ascórbico já foi utilizado de forma eficiente no controle da oxidação, durante o estabelecimento *in vitro* de pimenta-rosa (*Schinus*

terebinthifolius Raddi). Foram utilizados como explantes, segmentos nodais, introduzidos em meio MS adicionado de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico. Observou-se que esta concentração de ácido ascórbico, adicionada ao meio de cultura, favoreceu não apenas o controle da oxidação dos explantes, mas também a emissão de brotações (Pinto et al., 2017).

Da mesma forma, foram realizadas pesquisas visando controlar a contaminação e a oxidação, durante o estabelecimento *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.) cv Koroneiki. Foi observado que uso de carvão ativado no meio de cultura, a imersão e corte dos explantes de segmentos nodais em solução de ácido ascórbico, na concentração de 100 mg L⁻¹, foram eficientes na redução da oxidação nos explantes (Oliveira et al., 2021).

O ácido ascórbico, carvão ativado e PVP nas concentrações de 0,2 mg L⁻¹, 12 g L⁻¹ e 1,5 g L⁻¹, respectivamente, adicionados ao meio MS, foram efetivos no controle de oxidação fenólica durante o estabelecimento *in vitro* de aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva*). Foram utilizados como explantes, brotações apicais obtidas a partir de plântulas germinadas *in vitro* (Silva et al., 2023).

Quanto à reposta dos explantes, decorridos 30 dias da instalação do experimento, foram tomados dados relacionados com a porcentagem de reação *in vitro*, considerando o tipo e a origem dos explantes, em meios MS contendo: 1) 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D; 2) 4,95 mg L⁻¹ de BAP e 3) 0,2 mg L⁻¹ de AIB e 0,02 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 3).

A obtenção de plantas completas pela técnica de cultura de tecidos vegetais *in vitro* pode ser realizada por meio de três rotas morfogenéticas, sendo elas a proliferação de gemas; a organogênese, subdividida em adventícia direta e indireta; e a embriogênese somática, que também pode ocorrer de forma direta ou indireta (Chawla, 2004).

Nesta pesquisa, foram testados meios de cultura sem a adição de reguladores vegetais e com a adição de BAP, visando a proliferação de gemas e a organogênese direta, e aqueles com 2,4-D e a combinação de ANA + BAP, visando a organogênese indireta, via calogênese.

Em relação à proliferação de gemas a partir de tecidos meristemáticos, pesquisas realizadas para o estabelecimento *in vitro* de *C. sinuosus* resultaram em uma porcentagem de 93% de proliferação de gemas e regeneração de novas plantas, a partir de explantes do tipo talo, em meio MS líquido, sem reguladores vegetais (Arrabal et al., 2002). Entretanto, neste trabalho não foi possível avaliar a essa rota morfogenética, pois, conforme apresentado na

Tabela 1, os explantes utilizados para este propósito (talo e gemas axilares) se apresentaram 100% contaminados (Tabela 2).

Quanto a organogênese direta, foram realizados estudos com objetivo de estabelecer e multiplicar *C. sinuosus* in vitro, a partir de explantes de base das folhas. Foram obtidos múltiplos brotos a partir dos explantes cultivados por um período de 4 a 5 semanas, em meio MS adicionado de 4,95 mg L⁻¹ de BAP (Carneiro et al., 1998). Da mesma maneira, visando otimizar um protocolo de regeneração via organogênese direta para *Orthophytum mucugense*, segmentos de caules, folhas e raízes oriundos de plantas germinadas de sementes in vitro foram utilizados como explantes e cultivados em meio MS com metade da concentração dos sais inorgânicos. Observou-se que a adição do BAP na concentração de 2,22 mM, combinado com 0,65 mM de

ANA resultou em uma maior formação de brotos a partir dos segmentos de caule (Lima et al., 2012). Entretanto, neste trabalho, não houve organogênese direta nos explantes avaliados, nas condições de cultivo citadas. Tal fato pode ser atribuído às composições dos meios de cultura testadas, tanto em relação à concentração de sais inorgânicos, quanto àquela de BAP avaliada, que podem não ter sido adequadas para a espécie *C. bahianus*.

Foi observada organogênese indireta, via calogênese, em explantes de base da folha. Na Figura 4 pode-se observar a formação de calos na base de folhas oriundas de plantas verdes e marrons, cultivadas em meio MS contendo 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D (experimento 2), 30 dias após a introdução dos explantes in vitro. Inicialmente, os calos se apresentaram de forma translúcida (Figuras 4A e 4B) ou com a formação de pequenos grânulos (Figura 4C).

Tabela 3. Porcentagem de reação in vitro em função do tipo e origem dos explantes, decorridos 30 dias de instalação do experimento, em meios MS contendo 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D, aqueles com 4,95 mg L⁻¹ de BAP e também 0,2 mg L⁻¹ de AIB + 0,02 mg L⁻¹ de BAP. Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

Tipo de explante	1,105 mg L ⁻¹ de 2,4-D		4,95 mg L ⁻¹ de BAP		0,2 mg L ⁻¹ de AIB + 0,02 mg L ⁻¹ de BAP	
	Planta marrom	Planta verde	Planta marrom	Planta verde	Planta marrom	Planta verde
Base da folha	12,5 %	25%	0	0	0	0
Meio da folha	0	0	0	0	0	0
Raiz	0	0	--	--	0	0

O 2,4-D é uma auxina comumente utilizada para indução de calogênese in vitro. Similar aos resultados obtidos neste estudo, observou-se a indução de calos em estudo no qual foram utilizados explantes de base de folhas da bromélia (*Orthophytum mucugense*). Foram utilizados como explantes segmentos basais, medianos e apicais de folhas desta espécie, os quais foram cultivados em meio MS adicionado de 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D. Apenas os segmentos basais responderam ao estímulo de calogênese na concentração de 2,4-D citada (Bastos et al., 2016).

Além do trabalho citado, a indução de calogênese em bromélias, utilizando 2,4-D, em associação com o ANA, também foi estudada com o objetivo de estabelecer e multiplicar plantas do gênero *Guzmania*. Órgãos florais (pétalas e ovários) foram utilizados como explantes e cultivados em meio MS, com metade da concentração dos sais inorgânicos. As maiores porcentagens de calogênese (20% em explantes de pétalas e 35% em explantes de ovários) foram obtidas nos meios adicionados de 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D em conjunto com 1.0 mg L⁻¹ de

ANA, e aqueles com 1.5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0.5 mg L⁻¹ NAA, respectivamente (Huang et al., 2011).

Tal como foi proposto no experimento 3, o balanço entre auxinas e citocininas também pode resultar organogênese indireta, via calogênese. Gemas apicais de *Bromelia pinguin* foram cultivadas em meio MS, com metade da concentração dos sais inorgânicos, adicionado de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 5,0 mg L⁻¹ de BAP. Foi observado que a interação entre a auxina e a citocinina, nas concentrações citadas, aumentou a indução de calos in vitro (Marcondes et al., 2014). Entretanto, neste trabalho não houve este tipo de resposta, em meio MS adicionado de 0,2 mg L⁻¹ de AIB e 0,02 mg L⁻¹ de BAP, nos explantes base e meio de folhas e explantes de raízes (Tabela 2). Tal fato pode ser atribuído às composições dos meios de cultura testadas, tanto em relação à concentração de sais inorgânicos, quanto àquelas de BAP e ANA, que podem não ter sido adequadas para a espécie *C. bahianus*.

Decorridos 45 dias da instalação do experimento, os calos cultivados em meio MS contendo 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D (Figura 4) foram transferidos para meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP, para a

indução de brotos. Passados 30 dias da transferência dos calos para o meio citado, aquele apresentado na Figura 4A iniciou o processo de organogênese, conforme apresentado na Figura 5.

A partir do calo induzido em explantes de base de folha (Figura 6A), foram obtidas 15 plantas por organogênese indireta (Figura 6B). As plantas foram mantidas em tubos de ensaio (2,3 cm de diâmetro), contendo 15 mL de meio MS adicionado de 1,5 mg L⁻¹ de BAP. Decorridos 15 dias da individualização das plantas, foi observada a formação de brotos na sua base (Figura 6C).

O BAP é uma citocinina amplamente utilizada na indução de brotações in vitro, inclusive em pesquisas com diferentes espécies de bromélias. Esse regulador vegetal foi utilizado para a multiplicação de duas espécies de bromélias in vitro, em meio MS com metade da concentração dos sais inorgânicos, utilizando plantas completas obtidas por germinação de sementes. A bromélia *Aechmea aquilega* apresentou maior percentual de brotação em meio com 5,05 mg L⁻¹ de BAP, enquanto a *Bromelia balansae* necessitou de concentrações acima de 6,0 mg L⁻¹ de BAP para atingir a maior porcentagem de indução de brotos (Dias et al., 2020).

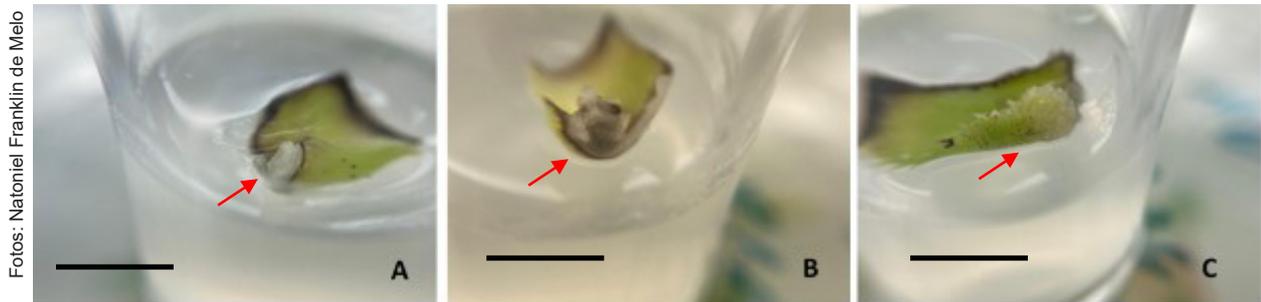


Figura 4. Formação de calos na base de folhas oriundas de plantas verdes (A e B) e marrom (C), cultivadas em meio MS contendo 1,105 mg L⁻¹ de 2,4-D, 30 dias após a introdução dos explantes in vitro (barra = 1 cm).

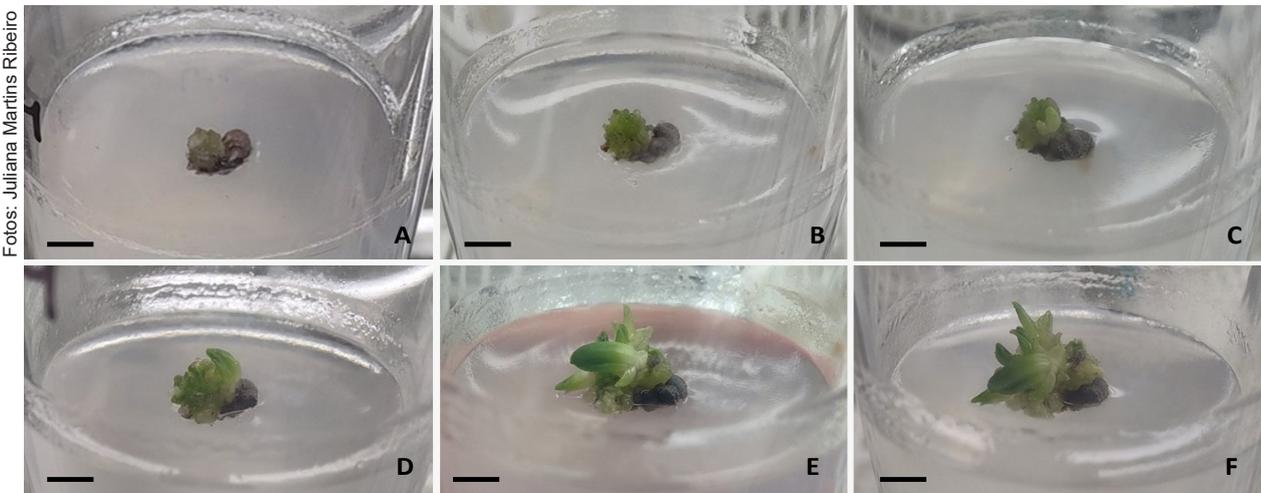


Figura 5. Organogênese em calo induzido em explante de base de folha de plantas verdes, 45 (A), 58 (B), 65 (C), 72 (D), 81 (E) e 86 (F) dias após a transferência meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP (barra = 0,5 cm).



Figura 6. Organogênese em calo induzido em explante de base de folha, cultivado em meio MS adicionado de 1,5 mg L⁻¹ de BAP durante 130 dias (A); plantas individualizadas obtidas por organogênese indireta, cultivada em meio MS adicionado de 1,5 mg L⁻¹ de BAP (B) e emissão de broto na base de uma planta obtida por organogênese indireta (C).

Da mesma forma, foram realizadas pesquisas com objetivo de avaliar a resposta morfogênica in vitro das espécies de bromélia *Aechmea miniata* e *Aechmea blanchetiana*. Segmentos caulinares, oriundos de plantas germinadas in vitro, foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP, e verificou-se que, para as duas espécies, a concentração 1,0 mg L⁻¹ de BAP mostrou maior eficiência para a indução de brotações in vitro (Garcia et al., 2021).

Conclusões

1) O prévio tratamento fitossanitário de plantas matrizes de *C. bahianus* com fungicida e bactericida contendo cloridrato de kasugamicina como princípio ativo, na concentração 1%, pode ser utilizado para a redução da contaminação e estabelecimento in vitro desta espécie.

2) A imersão dos explantes em solução de 10% de ácido ascórbico reduz a oxidação dos explantes de folha de *C. bahianus*.

3) Bases de folhas de *C. bahianus* podem ser utilizadas como explantes no estabelecimento in vitro desta espécie.

4) A concentração de 1,105 mg L⁻¹ do regulador vegetal 2,4-D induz a calogênese em explantes de tecidos de base de folhas de *C. bahianus*.

5) A concentração de 1,5 mg L⁻¹ de BAP induz brotações em calos obtidos a partir de tecidos de base de folhas de *C. bahianus*.

Agradecimentos

À Embrapa Semiárido e à FINEP (convênio 01.22.0614.00, proposta 0230/2019), pelo suporte financeiro, e à Angela Katiussia Nascimento dos Santos e Elenício Gomes Coelho, pelo apoio na instalação e acompanhamento dos experimentos.

Referências

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for in vitro preservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 11, p. 1081-1089, 2002. DOI: 10.1023/A:1015860804695.

BASTOS, F. J. O.; LIMA, A. P. P. S.; LIMA-BRITO, A.; SANTANA, J. R. F. Indução de calos de *Ortophytum mucugense* Wand. e Conceição. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, 20., 2016, Feira de Santana. **Ciência alimentando o Brasil**: anais. Universidade Estadual de Feira de Santana: Feira de Santana, 2016. Disponível em: <https://periodicos.uefs.br/index.php/semic/article/view/3053>. Acesso em: 4 jan. 2025.

BUSTAMANTE, M. M. C.; METZGER, J. P.; SCARIOT, A. O.; BAGER, A.; TURRA, A.; BARBIERI, A.; NEVES, A.; BOESING, A. L.; AGOSTINHO, A. A.; MARQUES, A. C.; DIAS, B.; GRELLE, C. E. V.; CAIXETA, D.; SAWYER, D.; SCARANO, F.; SOUSA, F. D. R.; FERNANDES, G. W.; QUEIROZ, H.; MIRANDA, H. S.; SCHONGART, J.; QUINTÃO, J. M. B.; MARTINELLI, L. A.; GOMES, L. C.; CUNHA, M. C. da; PIEDADE, M. T. F.; SATO, M. N.; VALE, M. M.; AQUINO, M. F. S. de; VOGT, N.; MAY, P.; FEARN-SIDE, P.; PRADO, R. B.; RODRIGUES, R. R.; THOMAZ, S. M.; PIVELLO, V. R.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; FARJALLA, V. F. Tendências e impactos dos vetores de degradação e restauração da biodiversidade e dos serviços ecossistêmicos. In: JOLY, C. A.; SCARANO, F. R.; SEIXAS, C. S.; METZGER, J. P.; OMETTO, J. P.; BUSTAMANTE, M. M. C.; PADGURSCHI, M. C. G.; PIRES, A. P. F.; CASTRO, P. F. D.; GADDA, T.; TOLEDO, P. (ed.). **1º Diagnóstico brasileiro de biodiversidade e serviços ecossistêmicos**. São Carlos, SP: Editora Cubo, 2019. cap. 3, p. 93-213.

CARNEIRO, L. A.; CÂNDIDO, M. S. D.; ARAÚJO, R. F. G.; FONSECA, M. H. P. B.; CROCOMO, O. J.; MANSUR, E. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L. B. Smith, an endemic stoloniferous species from Rio de Janeiro, Brazil. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 4, n. 3-4, p. 152-158, 1998.

CHAWLA, H. S. **Introduction to plant biotechnology**. 2. ed. Enfield: Science Publishers, 2004. 538 p.

DIAS, G. J. da S.; SILVA, L. F. da S.; CARNEIRO, L. A.; SOUSA, C. M. Multiplicação in vitro de bromélias *Aechmea aquilega* e *Bromelia balansae*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 17464-1747, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-062>.

GARCIA, F. R.; NEPOMUCENO, C. F.; ROCHA, M. A. C da; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F. de. Micropropagação de *Aechmea miniata* e *Aechmea blanchetiana*. **Rodriguésia**, v. 72, n. e01322018, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860202172037>.

GONZÁLEZ, R. L.; IANNICELLI, J. C.; ANDREA, B. V.; BOLOGNA, P.; PITTA-ÁLVAREZ, S.; ESCANDÓN, A. A protocol for the in vitro propagation and polyploidization of an interspecific hybrid of *Glandularia* (*G. peruviana* × *G. scrobiculata*). **Scientia Horticulturae**, v. 184, p. 46-54, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.032>.

HUANG, P. L.; LIAO, L. J.; TSAI, C. C.; LIU, Z. H. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 73-782011. DOI: 10.1007/s11240-010-9843-0.

INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Cryptanthus Otto & A. Dietr.** Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <http://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5991>. Acesso em: 5 jun. 2025.

KILL, L. H. P.; ARAÚJO, F. P. de; ANJOS, J. B. dos; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; AIDAR, S. de T.; SOUZA, A. V. de. Biodiversidade da Caatinga como potencialidade para a agricultura familiar. In: MELO, R. F. de; VOLTOLINI, T. V. (ed.). **Agricultura familiar dependente de chuva no Semiárido**. Brasília, DF, Embrapa, 2019. cap. 1, p. 15-43. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1114220>. Acesso em: 14 maio 2025.

LATTUADA, D. S.; GUASSO, L. Z.; OLIVEIRA, K. M. de; SILVA, V. M. da; SOUZA, P. V. D. de. Tipos de explantes para estabelecimento in vitro de orégano e hortelã. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 25, n. 3, p. 91-103, 2019. DOI: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>.

LIMA, C. O de C.; MARCHI, M. N. G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, C. E.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. de. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 249-254, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000200011>.

MARCONDES, M. A.; MIRANDA, D. P.; KARSBURG, I. V.; MAS-SAROTO, J. A.; RIBEIRO JÚNIOR, N. G. Calogênese in vitro de *Bromelia pinguin* L. sob efeito dos fitoreguladores ANA e BAP. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 736-743, 2014. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/CALOGENESE.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2025.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, jun. 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de desenvolvimento sustentável 2: fome zero e agricultura sustentável**. Brasília, DF, 2025. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 24 de maio. 2025.

NDAKIDEMI, C. F.; MNENEY, E.; NDAKIDEMI, P. A. Efeitos do ácido ascórbico no controle do escurecimento letal em cultura in vitro de *Brahylaena huillensis* usando segmentos nodais. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 1, p. 187-191, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.51024>.

OLIVEIRA, N. M.; RIBEIRO, S. A. F.; SOUZA, M. M. de. Controle de contaminação e oxidação no cultivo in vitro de oliveira (*Olea europaea* L.) cv. "Koroneik". **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, e30710514929, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i5.14929.

PINTO, F.; REZENDE, R. K. S.; SANTOS, S. C.; SCHMIDT, G. A. Efeito de antioxidantes e posição dos explantes no cultivo in vitro de pimenta rosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 19, n. 3, p. 431-436, 2017. Disponível em: https://www.sbpmed.org.br/admin/files/papers/file_jvpXB8ISAAt2.pdf. Acesso em: 20 jan. 2025.

RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F. de; OLIVEIRA, V. R. de. **Estabelecimento in vitro de faveleira (*Cnidocolus quercifolius* Pohl) sem espinhos**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2022. 19 p. il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 147). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1147865>. Acesso em: 18 fev. 2025.

ROSA, A. C. P. da; MARQUES, M. R. da C. Metodologia para preservação do fungicida mancozebe em amostras de solo. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1639-1642, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900025>.

SILVA, P. C. G. da; MOURA, M. S. B. de; KIILL, L. H. P.; BRITO, L. T. de L.; PEREIRA, L. A.; SÁ, I. B.; CORREIA, R. C.; TEIXEIRA, A. H. de C.; CUNHA, T. J. F.; GUIMARÃES FILHO, C. Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. da (ed.). **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. p. 19-48.

SILVA, L. M.; OLIVEIRA, L. S de; NOGUEIRA, A. da S.; SOUZA, N. dos S. de; JORGE, N. V.; HONORATO, G. A. de S.; SILVA, L. S. da. Controle da oxidação fenólica no cultivo in vitro de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. **Brazilian Journal of Production Engineering**, v. 9 n. 3, 2023. DOI: <https://doi.org/10.47456/bjpe.v9i3.40683>.

SINGH, K. K.; SINGH, S. P. A review: micropropagation of guava (*Psidium* spp.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 145-150, 2018. Disponível em: <https://www.phytojournal.com/archives/2018.v7.i4.4890/a-review-micropropagation-of-guava-ItemgtpsidiumItemgt-spp>. Acesso em: 14 jun. 2025.

THEODORO, G. de F.; MARINGONI, A. C. Ação de produtos químicos in vitro e in vivo sobre *Clavibacter michiganensis* SUBSP. michiganensis, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n.3, p. 439-443, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162000000300011>.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v. 7, p. 53-65, 1943.